



# **Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Unidad de Posgrado

## **Estudio de los alcaloides y flavonoides de las hojas de *Erythroxylum coca* Lam y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron; y evaluación de su actividad antioxidante, antibacteriana, tóxica y citotóxica**

### **TESIS**

Para optar el Grado Académico de Magíster en Toxicología

### **AUTOR**

Vidal Remigio GAMARRA OCHOA

### **ASESOR**

César Máximo FUERTES RUITÓN

Lima, Perú

2018



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Gamarra V. Estudio de los alcaloides y flavonoides de las hojas de *Erythroxylum coca* Lam y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron; y evaluación de su actividad antioxidante, antibacteriana, tóxica y citotóxica. [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Unidad de Posgrado; 2018.

---

473

15-R  
78.P

**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**  
**Universidad del Perú. Decana de América**  
**Facultad de Farmacia y Bioquímica**  
**UNIDAD DE POSGRADO**



**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR**  
**AL GRADO ACADÉMICO DE MAGISTER EN TOXICOLOGÍA**

No hay  
anexos

Impresos

Siendo las 10:00 hrs. del 16 de marzo de 2018 se reunieron en el auditorio de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el Jurado Examinador y Calificador de tesis, presidido por el Dr. Mario Carhuapoma Yance e integrado por los siguientes miembros: Mg. Cesar Maximo Fuertes Ruiton (Asesor), Mg. Felo Hugo Milla Flores, Mg. Cesar Augusto Canales Martinez y el Mg. Luis Alberto Inostroza Ruiz para la sustentación oral y pública de la tesis intitulada "Estudio de los alcaloides y flavonoides de las hojas de *Erythroxylum coca Lam* y *Erythroxylum novogranatense (Morris) Hieron*; y evaluación de su actividad antioxidante, antibacteriana, tóxica y citotóxica", presentada por el Bachiller en Farmacia y Bioquímica VIDAL REMIGIO GAMARRA OCHOA.

Acto seguido se procedió a la exposición de la tesis, con el fin de optar al Grado Académico de Magister en Toxicología. Formuladas las preguntas, estas fueron absueltas por el graduando.

A continuación el Jurado Examinador y Calificador de tesis procedió a la calificación, la que dio como resultado el siguiente calificativo:

Bueno (16)

Luego, el Presidente del Jurado recomienda que la Facultad proponga que se le otorgue al Bachiller en Farmacia y Bioquímica VIDAL REMIGIO GAMARRA OCHOA el Grado Académico de Magister en Toxicología.

Siendo las 11:46 hrs. se levanta la sesión.

Se extiende el acta en Lima a las 11:48 hrs. del 16 de marzo de 2018.

Dr. Mario Carhuapoma Yance (P. Asoc. T.C.)  
 Presidente

Mg. Cesar Maximo Fuertes Ruiton (P.P. D.T.)  
 Miembro Asesor

Mg. Felo Hugo Milla Flores (P.P. T.C.)  
 Miembro

Mg. Cesar Augusto Canales Martinez (P. Asoc. T.C.)  
 Miembro

Mg. Luis Alberto Inostroza Ruiz (P. Asoc. T.C.)  
 Miembro

Observaciones:

## DEDICATORIA

*A Dios que me acompaña,  
ilumina y guía mi camino  
todos los días de mi vida.*

*A mis padres Remigio y Julia;  
con mucho amor, gratitud y  
admiración por ser ejemplos de  
perseverancia y trabajo.*

*A mis hijos: Gonzalo y Mauricio,  
motivos principales de mi deseo  
de progreso y superación.*

*A mi esposa Miriyam por su  
comprensión y apoyo; por  
haberme alentado en todo  
momento para lograr mi más  
grande anhelo: La Maestría.*

*Al maestro Zay; Pedro, Noi  
e Ivanka; por sus sabias  
enseñanzas: “Todo por los  
demás”.*

*A Nadia, amiga y compañera de  
muchas horas de lucha y trabajo,  
por su inmensurable apoyo,  
colaboración y palabras de  
aliento.*

*A mi Alma Mater, la Universidad  
Nacional Mayor de San Marcos,  
“La Decana de América” como  
testimonio de mi eterna gratitud*

## AGRADECIMIENTOS

A mi maestro, gran amigo y asesor, el **Mg. César Máximo Fuertes Ruiton** por su invalorable apoyo, enseñanzas y por su sincera gran amistad. Su experiencia y vastos conocimientos estuvieron siempre presentes en el camino de mi carrera universitaria.

A los docentes **miembros del Jurado Examinador y Calificador:**

<b>Dr. Mario Carhuapoma Yance</b>	Presidente
<b>Mg. César Máximo Fuertes Ruiton</b>	Miembro
<b>Mg. Félix Hugo Milla Flores</b>	Miembro
<b>Mg. Luis Alberto Inostroza Ruíz</b>	Miembro
<b>Mg. César Augusto Canales Martínez</b>	Miembro

Por su invaluable aporte académico y sugerencias para la mejor redacción final de la tesis.

Al **Mg. Fernando Retuerto Prieto** por sus valiosos aportes y apoyo incondicional en la determinación de la actividad citotóxica.

A la **Dra. Silveria Dongo Gonzáles**, Directora Técnica de la Empresa Nacional de la Coca S.A.; por su generoso apoyo, al haber proporcionado las hojas de las especies vegetales estudiadas.

Al **Sr. Alejandro Roberto Izquierdo Miletich** de Laboratorios MERCK PERUANA S.A. por su importante apoyo en el suministro de reactivos para el desarrollo del presente trabajo de investigación.

Al equipo de jóvenes investigadores de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM: **Dennis Contreras Castillo, Gustavo Ruiz Pacco y Eri Goya Shimabukuru**; por su constante e incondicional apoyo en el desarrollo y ejecución del presente trabajo.

## ÍNDICE GENERAL

	p.
<b>Carátula interna</b>	i
<b>Acta de sustentación de tesis</b>	ii
<b>Dedicatoria</b>	iii
<b>Agradecimientos</b>	iv
<b>Índice general</b>	v
<b>Lista de tablas</b>	x
<b>Lista de figuras</b>	xii
<b>Resumen</b>	xiv
<b>Summary</b>	xv

### 1. INTRODUCCIÓN

1.1. Situación problemática	1
1.2. Formulación del problema	2
1.3. Justificación teórica	2
1.4. Justificación práctica	3
1.5. Objetivos	3
1.5.1. Objetivo general	3
1.5.2. Objetivos específicos	3

### 2. MARCO TEÓRICO

2.1. Marco filosófico o epistemológico de la investigación	5
2.2. Antecedentes de investigación	6
2.2.1. Antecedentes internacionales	6
2.2.2. Antecedentes nacionales	7
2.3. Bases Teóricas	10
2.3.1. Aspectos botánicos	10
2.3.2. Género <i>Erythroxylum</i>	10

2.3.3. Especies del género <i>Erythroxylum</i>	10
2.3.4. Variedades del género <i>Erythroxylum</i>	11
2.3.5. <i>Erythroxylum coca</i> Lam	11
2.3.5.1. Clasificación sistemática	11
2.3.5.2. Características morfológicas	11
2.3.5.3. Anatomía foliar: sección transversal de la hoja	12
2.3.5.4. Distribución geográfica	12
2.3.6. <i>Erythroxylum novogranatense</i> (Morris) Hieron	13
2.3.6.1. Clasificación sistemática	13
2.3.6.2. Características morfológicas	13
2.3.6.3. Anatomía foliar: sección transversal de la hoja	13
2.3.6.4. Distribución geográfica	14
2.4. Usos en la medicina tradicional	14
2.5. Composición química	15
2.6. Metabolitos primarios y secundarios	15
2.6.1. Alcaloides	16
2.6.1.1. Actividad antibacteriana de los alcaloides	17
2.6.2. Flavonoides	17
2.6.2.1. Propiedades medicinales de los flavonoides	19
2.6.2.2. Actividad antibacteriana de los flavonoides	20
2.6.2.3. Actividad antioxidante de los flavonoides	23
2.7. Determinación de la actividad antioxidante	23
2.7.1. Método de la captación del radical 2,2-difenildipicrilhidracil (DPPH)	24
2.8. Determinación de la actividad antibacteriana	25
2.8.1. Métodos de difusión	25
2.9. Determinación de toxicidad	27
2.9.1. Bioensayo de toxicidad mediante el método de la <i>Artemia salina</i>	27
2.10. Determinación de citotoxicidad	27
2.10.1. Bioensayo de citotoxicidad en erizos de mar ( <i>Tetrapygus niger</i> )	27

### 3. METODOLOGÍA

3.1. Lugar de ejecución	29
3.2. Tipo de investigación	29
3.3. Material biológico	29
3.3.1. Hojas de <i>Erythroxylum coca</i> Lam y <i>Erythroxylum novogranatense</i> (Morris) Hieron	29
3.3.2. Erizos de mar ( <i>Tetrapygus niger</i> )	30
3.3.3. Nauplios de <i>Artemia salina</i>	30
3.3.4. Bacterias de ensayo	30
3.4. Materiales, reactivos, equipos	31



3.4.1. Material de laboratorio	31
3.4.2. Reactivos	31
3.4.3. Equipos	31
3.4.4. Medios de cultivo	32
3.5. Determinación de metabolitos secundarios de las hojas de <i>Erythroxylum coca</i> Lam y <i>Erythroxylum novogranatense</i> (Morris) Hieron	32
3.5.1. Recolección y selección de las hojas de <i>Erythroxylum coca</i> Lam y <i>Erythroxylum novogranatense</i> (Morris) Hieron	32
3.5.2. Obtención de extractos etanólicos de las hojas de <i>Erythroxylum coca</i> Lam y <i>Erythroxylum novogranatense</i> (Morris) Hieron	32
3.5.3. <i>Screening</i> fitoquímico del extracto etanólico de las hojas de <i>Erythroxylum coca</i> Lam y <i>Erythroxylum novogranatense</i> (Morris) Hieron	33
3.5.4. Remoción de clorofila del extracto etanólico de las hojas de <i>Erythroxylum coca</i> Lam y <i>Erythroxylum novogranatense</i> (Morris) Hieron	33
3.5.5. Extracción y aislamiento de alcaloides totales del extracto etanólico de <i>Erythroxylum coca</i> Lam y <i>Erythroxylum novogranatense</i> (Morris) Hieron	34
3.5.6. Cuantificación de alcaloides totales del extracto etanólico de <i>Erythroxylum coca</i> Lam y <i>Erythroxylum novogranatense</i> (Morris) Hieron	35
3.5.7. Extracción y aislamiento de flavonoides totales del extracto etanólico de <i>Erythroxylum coca</i> Lam y <i>Erythroxylum novogranatense</i> (Morris) Hieron	35
3.6. Bioensayo de toxicidad de alcaloides aislados del extracto etanólico de las hojas de <i>Erythroxylum coca</i> Lam y <i>Erythroxylum novogranatense</i> (Morris) Hieron mediante el método de la <i>Artemia salina</i>	36
3.7. Actividad antioxidante de los flavonoides totales del extracto etanólico de las hojas de <i>Erythroxylum coca</i> Lam y <i>Erythroxylum novogranatense</i> (Morris) Hieron mediante el ensayo de DPPH	38
3.8. Determinación de la actividad antibacteriana <i>in vitro</i> de los alcaloides y flavonoides totales del extracto etanólico de las hojas de <i>Erythroxylum coca</i> Lam y <i>Erythroxylum novogranatense</i> (Morris) Hieron	39
3.8.1. Método de difusión en Agar	39
3.9. Bioensayo de citotoxicidad de los extractos crudos de <i>Erythroxylum coca</i> Lam y <i>Erythroxylum novogranatense</i> (Morris) Hieron en erizos de mar ( <i>Tetrapygus niger</i> )	40
3.9.1. Obtención de gametos	40
3.9.2. Fertilización	41
3.9.3. Preparación del extracto	42

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados	43
4.1.1. Principales metabolitos de las hojas de <i>Erythroxylum coca</i> Lam y <i>Erythroxylum novogranatense</i> (Morris) Hieron	43
4.1.2. Extracción y aislamiento de los metabolitos del extracto etanólico de las hojas <i>Erythroxylum coca</i> Lam y <i>Erythroxylum novogranatense</i> (Morris) Hieron	45
4.1.3. Perfil cromatográfico de los alcaloides totales del extracto etanólico de las hojas de <i>Erythroxylum coca</i> Lam y <i>Erythroxylum novogranatense</i> (Morris) Hieron	45
4.1.4. Cuantificación de alcaloides totales del extracto etanólico de las hojas de <i>Erythroxylum coca</i> Lam y <i>Erythroxylum novogranatense</i> (Morris) Hieron	47
4.1.5. Bioensayo de toxicidad letal media de los alcaloides totales del extracto etanólico de las hojas de <i>Erythroxylum coca</i> Lam y <i>Erythroxylum novogranatense</i> (Morris) Hieron; mediante el método de <i>Artemia salina</i>	47
4.1.6. Actividad antioxidante de los flavonoides totales del extracto etanólico de las hojas de <i>Erythroxylum coca</i> Lam y <i>Erythroxylum novogranatense</i> (Morris) Hieron; mediante el ensayo de DPPH	48
4.1.7. Actividad antibacteriana por difusión en agar de los alcaloides y flavonoides totales del extracto etanólico de las hojas de <i>Erythroxylum coca</i> Lam y <i>Erythroxylum novogranatense</i> (Morris) Hieron	51
4.1.8. Bioensayo de citotoxicidad en erizos de mar ( <i>Tetrapygus niger</i> )	55
4.2. Discusión	58

<b>CONCLUSIONES</b>	67
---------------------	----

<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	68
-----------------------------------	----

## ANEXOS

Anexo 1 Constancia N° 07-USM-2013, sobre “taxonomía de <i>Erythroxylum coca</i> Lam”	
Anexo 2 Constancia N° 07-USM-2013, sobre “taxonomía de <i>Erythroxylum novogranatense</i> (Morris) Hieron	

Anexo 3    Flujograma de las diferentes etapas de estudio

Anexo 4    Remoción de clorofila

## LISTA DE TABLAS

**Tabla 1.** *Screening* fitoquímico del extracto etanólico de las hojas de *Erythroxylum coca* Lam

**Tabla 2.** *Screening* fitoquímico del extracto etanólico de las hojas de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron

**Tabla 3.** Contenido de alcaloides y flavonoides totales del extracto etanólico de las hojas de *Erythroxylum coca* Lam y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron

**Tabla 4.** Cromatograma de los alcaloides totales del extracto etanólico de las hojas de *Erythroxylum coca* Lam y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron y Rf de sus metabolitos

**Tabla 5.** Porcentaje de alcaloides totales del extracto etanólico de las hojas de *Erythroxylum coca* Lam y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron

**Tabla 6.** Evaluación de toxicidad (CL<sub>50</sub>) de los alcaloides totales del extracto etanólico de las hojas de *Erythroxylum coca* Lam y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron; mediante el método de *Artemia salina*

**Tabla 7.** Clasificación de toxicidad según Cyted.

**Tabla 8.** Actividad antioxidante de los flavonoides totales del extracto etanólico de las hojas de *Erythroxylum coca* Lam y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron; frente al radical DPPH

**Tabla 9.** Actividad antioxidante del ácido ascórbico frente al radical DPPH

**Tabla 10.** Halos de inhibición en agar Müller-Hinton, de los alcaloides y flavonoides totales del extracto etanólico de las hojas de *Erythroxylum coca* Lam

**Tabla 11.** Halos de inhibición en agar Müller-Hinton, de los alcaloides y flavonoides totales del extracto etanólico de las hojas de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron

**Tabla 12.** Halos de inhibición para los controles positivo y negativo

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Hojas de *Erythroxylum coca* Lam

**Figura 2.** Hojas de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron

**Figura 3.** Reducción del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

**Figura 4.** Mecanismo de reacción del ácido ascórbico frente al radical DPPH

**Figura 5.** *Screening* fitoquímico del extracto etanólico de las hojas de (A) *Erythroxylum coca* Lam y (B) *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron

**Figura 6.** Cromatograma en capa fina de los alcaloides: cocaína y benzoilecgonina, aislados del extracto etanólico de las hojas de (A) *Erythroxylum coca* Lam y (B) *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron

**Figura 7.** Cromatograma en capa fina de los flavonoides totales aislados del extracto etanólico de las hojas de (A) *Erythroxylum coca* Lam y (B) *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron

**Figura 8.** Curva de captación de DPPH de los flavonoides totales del extracto etanólico de las hojas de *Erythroxylum coca* Lam

**Figura 9.** Curva de captación de DPPH de los flavonoides totales del extracto etanólico de las hojas de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron

**Figura 10.** Porcentaje de captación de radical DPPH del ácido ascórbico

**Figura 11.** Actividad antibacteriana de los alcaloides y flavonoides totales del extracto etanólico de las hojas de *Erythroxylum coca* Lam frente a *Staphylococcus aureus*

**Figura 12.** Actividad antibacteriana de los alcaloides y flavonoides totales del extracto etanólico de las hojas de *Erythroxylum coca* Lam frente a *Staphylococcus epidermidis*

**Figura 13.** Actividad antibacteriana de los alcaloides y flavonoides totales del extracto etanólico de las hojas de *Erythroxylum coca* Lam frente a *Escherichia coli*

**Figura 14.** Actividad antibacteriana de los alcaloides y flavonoides totales del extracto etanólico de las hojas de *Erythroxylum coca* Lam frente a *Pseudomona aeruginosa*

**Figura 15.** Actividad antibacteriana de los alcaloides y flavonoides totales del extracto etanólico de las hojas de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron frente a *Staphylococcus aureus*

**Figura 16.** Actividad antibacteriana de los alcaloides y flavonoides totales del extracto etanólico de las hojas de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron frente a *Staphylococcus epidermidis*

**Figura 17.** Actividad antibacteriana de los alcaloides y flavonoides totales del extracto etanólico de las hojas de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron frente a *Escherichia coli*

**Figura 18.** Actividad antibacteriana de los alcaloides y flavonoides totales del extracto etanólico de las hojas de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron frente a *Pseudomona aeruginosa*

**Figura 19.** Embrión normal de erizo de mar (*Tetrapygus niger*) en estado de *pluteus*

**Figura 20.** (A) Embrión normal de erizo de mar (*Tetrapygus niger*) en estado de blástula. (B) Embrión normal de erizo de mar (*Tetrapygus niger*) en estado de gástrula

**Figura 21.** Embrión normal de erizo de mar (*Tetrapygus niger*) en estado de prisma

**Figura 22.** Embrión de erizo de mar (*Tetrapygus niger*) en un estado de prisma alterado

## RESUMEN

El objetivo del estudio fue evaluar la composición química, actividad antioxidante, actividad tóxica, citotóxica y actividad antibacteriana de los alcaloides y flavonoides aislados del extracto etanólico liofilizado de las hojas de *Erythroxylum coca* Lam y *Erithroxylum novogranatense* (Morris) Hieron. Las muestras de hojas fueron proporcionadas por la Empresa Nacional de la Coca S.A. Los ensayos biológicos se realizaron en el Instituto de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales “Juan de Dios Guevara” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica UNMSM; así como en el Instituto de Investigación “Antonio Raimondi” de la Facultad de Ciencias Biológicas UNMSM. El *screening* fitoquímico se realizó desarrollando el perfil cromatográfico, el extracto fue preparado por el método de maceración en etanol y a partir de él se aislaron los alcaloides y flavonoides, la evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* se realizó utilizando el método del radical DPPH; la actividad tóxica se realizó mediante el bioensayo en *Artemia salina*, la actividad antibacteriana *in vitro* se determinó mediante el método de difusión en agar y la actividad citotóxica mediante el bioensayo en erizo de mar (*Tetrapygyus niger*). Se demostró la presencia de alcaloides, flavonoides, taninos y saponinas en ambas especies. El porcentaje de inhibición del radical DPPH fue de 93,9 % para los flavonoides de *E. novogranatense*. Los alcaloides de *E. coca* y *E. novogranatense* no mostraron toxicidad en el modelo de la *Artemia salina*. Los alcaloides aislados de *E. coca* exhibieron buena actividad frente a *S. epidermis* y *P. aeruginosa*, excepto para *E. coli*. Los flavonoides aislados de *E. novogranatense* mostraron buena actividad frente a *S. epidermidis*. El extracto de *E. coca* mostró actividad genotóxica a la concentración de 1000 µg/mL.

**Palabras clave:** *Erythroxylum*, flavonoide, alcaloide, antioxidante, toxicidad, citotóxicidad, antibacteriano, *Artemia salina*, *Tetrapygyus niger*.



## SUMMARY

The objective of the study was to evaluate the chemical composition, antioxidant, toxic, cytotoxic and antibacterial activity of the isolated alkaloids and flavonoids ethanolic extract lyophilized of the leaves of *Erythroxylum coca* Lam and *Erithroxylum novogranatense* (Morris) Hieron; as well as. The leaf samples were provided by the National Coca Enterprise (*Empresa Nacional de la Coca S.A.*). The biological tests were carried out at the Institute of Pharmaceutical Sciences and Natural Resources "Juan de Dios Guevara", of the Faculty of Pharmacy and Biochemistry UNMSM; as well as in the Research Institute "Antonio Raimondi" Faculty of Biological Sciences UNMSM. The phytochemical screening was carried out by developing the chromatographic profile, the extract was prepared using the maceration method in ethanol and from the extract, alkaloids and flavonoids were isolated, the evaluation of the antioxidant activity *in vitro* was carried out using the DPPH free radical scavenging method; the toxic activity was carried out by means of the bioassay in *Artemia salina*, the antibacterial activity *in vitro* was determined using the diffusion method in agar and the cytotoxic activity by means of the bioassay in sea urchin (*Tetrapygus niger*). The presence of alkaloids, flavonoids, tannins and saponins was shown in both species. The inhibition percentage of the DPPH radical was 93.9 % for the flavonoids of *E. novogranatense*. Alkaloids of *E. coca* and *E. novogranatense* showed no toxicity in the *Artemia salina* model. The alkaloids isolated from *E. coca* showed good activity against *S. epidermis* and *P. aeruginosa*, except for *E. coli*. Flavonoids isolated from *E. novogranatense* showed good activity against *S. epidermidis*. The extract of *E. coca* showed genotoxic activity at the concentration of 1000 µg / mL.

**Key words:** *Erythroxylum*, flavonoid, alkaloid, antioxidant, toxicity, cytotoxicity, antibacterial, *Artemia salina*, *Tetrapygus niger*.

## **CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN**

### **1.1. Situación problemática**

La coca es uno de los cultivos más importantes del Perú por su enorme significado económico y social. En el año 2015, la superficie cultivada de hoja de coca fueron 40 300 ha; de ella, una parte es consumida por la población campesina como masticatorio y el 90 % es destinada a la elaboración de pasta básica de cocaína; trayendo esto último, consecuencias funestas para el país, como asesinatos, sicariato, violencia y corrupción (Machado, 1980; Unodc, 2016).

Por otro lado, la resistencia a los agentes antibacterianos se ha convertido en un importante problema mundial, haciendo imprescindible el desarrollo de nuevos productos antibacterianos. Por ello, la industria farmacéutica y compañías biotecnológicas, están intensificando esfuerzos para descubrir nuevos agentes antibacterianos (Jasim, Hadi, Abdulhasan, 2015).

De lo mencionado, la hoja de coca podría constituir una alternativa en el tratamiento de las infecciones bacterianas, que es considerado un problema de salud pública debido a su elevado costo, por la resistencia a los agentes antibacterianos y al alto impacto económico que genera.

Las plantas son fuente rica de metabolitos secundarios con importante actividad biológica. Se ha demostrado que estos metabolitos, ejercen un papel protector contra la formación de radicales libres (antioxidante) y desempeñan un papel beneficioso en el tratamiento de las enfermedades (Tanaka, Da Silva, Nakamura, Dias Filho & De Olivera, 2006).

Para el ensayo de toxicidad y citotoxicidad se utilizaron los bioensayos de *Artemia salina*, ampliamente utilizada en las etapas preliminares de la

investigación fitoquímica, para la determinación de la Concentración Letal Media (CL<sub>50</sub>); y el bioensayo de citotoxicidad en huevos fértiles de erizos de mar (*Tetrapygus niger*), como método de *screening* genotóxico-teratogénico para sustancias aisladas o mezclas complejas a partir de los extractos vegetales.

## 1.2. Formulación del problema

¿Cuál será la actividad tóxica sobre nauplios de *Artemia salina*, actividad antioxidante *in vitro* sobre el radical DPPH, actividad antibacteriana *in vitro* sobre cepas de *S. epidermidis*, *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa*; y citotóxica sobre erizos de mar (*Tetrapygus niger*); que presentan los alcaloides y flavonoides totales, aislados del extracto etanólico de las hojas de *Erythroxylum coca* Lam y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron?

## 1.3. Justificación teórica

La validación del uso etnobotánico, constituye la razón primordial de la investigación fitoquímica e instrumento metodológico en el estudio sistematizado de los recursos vegetales como aporte del conocimiento al servicio de la salud y en defensa de la vida.

La investigación fitoquímica realizada aporta como principales metabolitos de las hojas de coca a los alcaloides y flavonoides. A los flavonoides y alcaloides, se les ha atribuido muchas propiedades farmacológicas, como antioxidantes y antibacterianos (Sivasothy, Fariza, Leong, Ibrahim & Awang, 2013; Jasim *et al.*, 2015; Alghazeer *et al.*, 2017).

Por lo anteriormente descrito, es de gran interés, el estudio de agentes antioxidantes de origen vegetal, como alternativas terapéuticas para el manejo de infecciones bacterianas y patologías crónico degenerativas de relevancia epidemiológica en nuestro ámbito regional, como el cáncer.

## 1.4. Justificación práctica

Actualmente, la industria farmacéutica y cosmética, están en la búsqueda constante de nuevos principios activos naturales, especialmente con propiedades antibacterianas y antioxidantes. La biodiversidad peruana tiene un gran potencial para ofrecer al mercado; sin embargo, son pocos los estudios realizados sobre recursos vegetales peruanos que demuestren la seguridad de su uso y/o eficacia.

El presente estudio, busca nuevas terapias alternativas en el tratamiento de las infecciones bacterianas, que sean menos tóxicas y/o con menores efectos adversos que los antibióticos tradicionales, que en su gran mayoría presentan resistencia bacteriana; a fin de contribuir con alternativas para mejorar la salud de la población de escasos recursos económicos. Asimismo, ampliar los conocimientos teóricos de tipo tóxico, antioxidante y citotóxico de las especies vegetales *Erythroxylum coca* Lam y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron; que sirvan como antecedente para posteriores estudios.

## 1.5. Objetivos

### 1.5.1. Objetivo general

Identificar los alcaloides y flavonoides totales de los extractos etanólicos de las hojas de *Erythroxylum coca* Lam y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron, según sus propiedades biológicas.

### 1.5.2. Objetivos específicos

1. Identificar los principales metabolitos secundarios de las hojas de *Erythroxylum coca* Lam y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron, mediante *screening* fitoquímico.

2. Evaluar la actividad antioxidante de los flavonoides totales de *Erythroxylum coca* Lam y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron, sobre el radical DPPH.
3. Evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* de los flavonoides y alcaloides totales de *Erythroxylum coca* Lam y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron sobre las cepas de *S. epidermidis*, *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa*.
4. Evaluar la toxicidad de los alcaloides totales de *Erythroxylum coca* Lam y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron en un modelo de *Artemia salina*.
5. Evaluar la citotóxicidad de los extractos crudos de las hojas de *Erythroxylum coca* Lam y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron sobre erizos de mar (*Tetrapygus niger*).

## **CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO**

### **2.1. Marco filosófico o epistemológico de la investigación**

En el presente trabajo de investigación, se consideró que la epistemología es la rama de la filosofía, que estudia la investigación científica y su producto, el conocimiento científico.

Hay evidencias que demuestran que los incas conocían muchos productos de origen vegetal, beneficiosos en caso de enfermedades. Con frecuencia, utilizaban el cocimiento de las hojas de las plantas. Por sus efectos anestésicos, la coca fue usada para aliviar el dolor y en ritos mágicos para restablecer la salud.

Entre los conocimientos supuestos sobre el objeto de estudio, se sabe que la coca es una de las plantas de cultivo más antiguas de Sudamérica, pero aún es poco conocida por la ciencia moderna.

En el marco filosófico, en la presente investigación, se utilizó la metodología científica para demostrar la actividad antioxidante, toxica, antibacteriana y citotóxica; de los extractos etanólicos de las hojas de *Erythroxylum coca* Lam y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron. Se planteó la hipótesis de la investigación, para demostrar si existe relación entre la variable independiente y la variable dependiente, fundamentada en que una “hipótesis científica es una ley científica confirmada, que afirma una relación constante entre dos o más variables, cada una de las cuales representa una propiedad de sistemas concretos”.

## 2.2. Antecedentes de investigación

Se han descrito una gran cantidad de trabajos relacionados a las propiedades antioxidantes y antibacterianas de los alcaloides y flavonoides presentes en diversas especies vegetales.

### 2.2.1. Antecedentes internacionales

Su, Li, Chen, Zhang & Wang (2011) determinaron la actividad antibacteriana de siete alcaloides obtenidas de la parte aérea de *Hypecoum erectum* L., Protopine (1), Cryptopine (2), Allocryptopine (3), Hypecorinine (4), (-)-N-Metilcanadina (5), Oxohydrastinine (6) y N-Methylcorydaldina (7); frente a seis bacterias (3 gram positivas y 3 gram negativas) mediante el método de difusión en disco; con excepción de N-metilcorydaldina (7), todos los alcaloides presentaron actividad antibacteriana *in vitro*.

Manosalva, Mutis, Urzúa, Fajardo y Quiroz (2016) determinaron la actividad antibacteriana de los extractos de alcaloides de hojas, tallos y raíces de *Berberis microphylla* frente a bacterias gram positivas y gram negativas *in vitro*, tuvieron actividad significativa sólo contra bacterias gram positivas. Las pruebas de difusión de disco demostraron que el extracto de raíz mostró una actividad similar frente a *B. cereus* y *S. epidermidis* en comparación con los antibióticos comerciales ampicilina y cefalotina; la berberina pura, principal componente de los extractos de alcaloides, resultó ser sólo activa frente a *S. aureus* y *S. epidermidis* con actividad similar a la del extracto de raíz. Además, se confirmaron los efectos sinérgicos o indiferentes entre los extractos de alcaloides y los antibióticos contra cepas bacterianas.

Según González y col. (2005) refieren que desde el punto de vista fitoquímico, se han realizado estudios sobre 56 especies del género *Erythroxylum*, para las que se registra con mayor abundancia la presencia

de alcaloides, terpenoides y flavonoides como principales grupos químicos. Asimismo, mencionan el uso etnomédico de 16 especies, las que se han utilizado como estimulante y para producir euforia, aliviar la fatiga y los desórdenes estomacales. Con respecto a las acciones biológicas, se han estudiado 15 especies del género y las acciones biológicas evaluadas con mayor frecuencia fueron el efecto citotóxico, antibacteriano y antiviral.

Martínez y col. (2006) demostraron que el género *Erythroxylum* muestra una gran variedad en cuanto a su actividad biológica; determinaron la toxicidad preliminar de extractos de *Erythroxylum confusum* Britt, evaluando las diferentes épocas de colecta, los tipos de preparación de extractos y del método de secado; mediante un bioensayo con camarones de mar (*Artemia salina*). Para ninguno de los ensayos realizados, el valor promedio de la CL<sub>50</sub> se comportó por debajo de 640 µg/mL. De esta manera concluyeron que según el método de la *Artemia Salina*, las preparaciones obtenidas de esta especie, se pueden considerar como no tóxicas, recomendando continuar con las investigaciones biológicas para evaluar sus efectos farmacológicos.

### **2.2.2. Antecedentes nacionales**

Al presente, no existen estudios comparativos entre los alcaloides y flavonoides aislados de los extractos etanólicos de las hojas de *Erythroxylum coca* Lam y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron, y su toxicidad sobre la *Artemia salina*, actividad antioxidante *in vitro* a través de la captación del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), actividad antibacteriana y citotoxicidad sobre erizos de mar (*Tetrapygus niger*).

Cueva, González, Infantes, Fukusaki y León (1980) propusieron el aprovechamiento industrial de la coca; ya que en vez de exportar las hojas para la obtención de extractos para la elaboración de bebidas gaseosas, se daría un valor agregado, al sustituirla por extractos descocainizados. Adicionalmente, se beneficiaría con la comercialización



en el mercado farmacéutico de la cocaína obtenida como subproducto. Para ello, realizaron la obtención de extractos de coca descocainizadas y como subproducto cocaína, utilizando las hojas de coca recolectadas en Cusco, Trujillo y Huánuco. Utilizaron el método de relixiviación para la obtención de los extractos, cuantificaron la cocaína por el método de Tanker, se descocainizó con hidróxido de amonio al 28 % - 29 %. Se procedió a la obtención de los extractos metanólicos. Concluyeron que, las hojas de coca procedentes del Cusco mostraron mayor cantidad de cocaína, que las de Huánuco y Trujillo; y que el método de relixiviación es que dio mejores resultados para la obtención de extractos descocainizados.

Garro y Pastor (1990) propusieron el aprovechamiento de la cocaína para uso terapéutico, para ello, efectuaron una hidrólisis ácida, obteniendo el Clorhidrato de Ecgonina, luego en la estructura química de la cocaína reemplazaron el éster metílico presente en la zona correspondiente al pivote alifático por el éster etílico, ya que los productos de descomposición de esta última resultan ser menos tóxicos que del primero, obteniendo el éster etílico de ecgonina. A partir de esta síntesis se podrían realizar otras; recomendando acilar el grupo alcohol por el ácido acetil salicílico para obtener una cocaína modificada en los grupos metilo y benzoilo por etilo y acetil salicílico, la misma que por hidrolisis en el organismo humano podría producir además del efecto anestésico un efecto analgésico similar al de la aspirina.

Li (1994) realizó el estudio de las propiedades inhibitorias del crecimiento de hongos oportunistas *in vitro* de mates de *Erythroxylum coca* Lam y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron, mediante el método de la siembra directa y los hongos *Alternaria sp.*, *Aspergillus niger*, *Mucor mucu* y *Penicillium nonatum*. Concluyendo que los mates de coca de ambas especies a la concentración de 57 µg/mL presentan actividad inhibitoria de los hongos *Aspergillus niger* y *Mucor mucu*, más no para *Alternaria sp.* y *Penicillium nonatum*.

Borrovic (2006) determinó que el extracto alcohólico de las hojas de *Erythroxylum novogranatense* var. *Truxillense*, a las concentraciones de 250, 500, 1000 y 1500 µg/20mL presentaron actividad antibacteriana frente a la flora mixta salival.

Castro (2008) determinó la composición química, la actividad antioxidante *in vitro* y la actividad antibacteriana *in vitro* frente a *Streptococcus mutans*, del aceite esencial de las hojas frescas de *Erythroxylum novogranatense* (Morris). La determinación de la composición química se realizó mediante la Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas, para la determinación de la actividad antioxidante utilizó el método de captación del radical 2,2-difenilpicrilhidrazil (DPPH), el método de captación del radical libre anión superóxido y el método de captación del radical hidroxilo; y para la determinación de la actividad antibacteriana utilizó el método de difusión en agar. Concluyendo que la composición química del aceite esencial de *Erythroxylum novogranatense*, presenta actividad antioxidante y actividad antibacteriana frente a *Streptococcus mutans*

Ventura (2009) determinó la composición química y la actividad antibacteriana *in vitro* frente a *Staphylococcus aureus* del aceite esencial de *Erythroxylum coca* Lam, la composición química fue determinada por Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masa. La evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* se realizó mediante el método de excavación placa cultivo. Concluyó que los componentes químicos del aceite esencial de *Erythroxylum coca* Lam, presentan actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*

Palacin (2013) realizó el estudio fitoquímico y antibacteriano de los flavonoides de las hojas de *Erythroxylum coca* Lam y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) var. *Truxillense*. Mediante la cromatografía en papel realizó el fraccionamiento de los flavonoides; cuantificó los flavonoides totales en hojas secas y en el extracto seco por espectrofotometría. El estudio registró como posible flavonoide a la flavona luteolina para *E. coca* y el flavonol kaempferol para *E. novogranatense*. Estos flavonoides, a las concentraciones utilizadas no

presentaron actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*.

## **2.3. Bases Teóricas**

### **2.3.1. Aspectos botánicos**

La coca es una de las plantas de cultivo más antigua de Sudamérica, pero aún es poco conocida por la ciencia moderna. La botánica general, química, ecología, distribución, geografía y arqueología de la coca, se encuentran todavía en discusión (Plowman, 1980).

### **2.3.2. Género *Erythroxylum***

La palabra coca se refiere a varias especies y variedades del género *Erythroxylum*; éste es un género que abarca 250 especies, de las cuales alrededor de 200 son originarias de los trópicos americanos. Todas las especies americanas de este género son arbustos o pequeños árboles. Las especies silvestres crecen a menos de 1000 metros de altitud y las cultivadas en alturas de 2000 metros. Todas las especies de *Erythroxylum* han sido halladas en las zonas orientales de montaña en Colombia, Ecuador y Perú (Plowman, 1980).

### **2.3.3. Especies del género *Erythroxylum***

Las especies de *Erythroxylum* cultivadas en el Perú, pertenecen a dos especies íntimamente relacionadas entre sí: *Erythroxylum coca* y *Erythroxylum novogranatense*; diferenciándose de acuerdo a su morfología, anatomía, ecología, distribución geográfica y sus relaciones de cultivo (Plowman, 1980).

### 2.3.4. Variedades del género *Erythroxylum*

En la especie *Erythroxylum coca* Lam existen cuatro cultivares: *Erythroxylum coca* cv. *lambrán* (Ayacucho, Cusco, Puno), *Erythroxylum coca* cv. *mollecoca* (Huánuco), *Erythroxylum coca* cv. *fusiforme* (Tingo María, Monzón) y *Erythroxylum coca* cv. *ovoide* (Huánuco) (Machado, 1980).

La especie de coca ampliamente cultivada en el norte peruano corresponde a *Erythroxylum novogranatense*, que por hallarse alejada geográficamente de su centro de origen, ha tomado el carácter varietal denominándose *Erythroxylum novogranatense* var. *Truxillense*; ya que fue introducida al Perú desde Colombia durante el incanato (Machado, 1980).

### 2.3.5. *Erythroxylum coca* Lam

**2.3.5.1. Clasificación sistemática.** Según el Sistema de Clasificación de A. Cronquist (1988), la especie vegetal estudiada y clasificada tiene la siguiente posición taxonómica (ver Anexo 1):

<b>DIVISIÓN</b>	: Magnoliophyta
<b>CLASE</b>	: Magnoliopsida
<b>SUB. CLASE</b>	: Rosidae
<b>ORDEN</b>	: Linales
<b>FAMILIA</b>	: Erythroxylaceae
<b>GÉNERO</b>	: <i>Erythroxylum</i>
<b>ESPECIE</b>	: <i>Erythroxylum coca</i> Lam
<b>Sinonimia vulgar</b>	: “Coca”

**2.3.5.2. Características morfológicas.** Las plantas alcanzan hasta 3 m de altura; el tallo y las ramas presentan una corteza gris plateada con ramillas rojizas; se le reconoce por sus hojas de forma oblongo-elíptica, 8,0 cm de largo por 4,2 cm de ancho; son de color verde oscuro, las flores presentan la corola con pétalos de color blanco

cremoso. El fruto es una pequeña drupa de color granate y mide 10 mm de largo en promedio (Machado, 1980).

**2.3.5.3. Anatomía foliar: sección transversal de la hoja.** Tiene un grosor que varía entre 84 a 174  $\mu\text{m}$ , las células de la epidermis superior varían ligeramente en grosor, siendo las más pequeñas la mitad del tamaño de las grandes; las células de la epidermis inferior son algo más grandes y presentan papilas prominentes con porciones apicales ligeramente engrosadas; el parénquima en empalizada es delgado, variando en forma y tamaño las células que la conforman. El parénquima esponjoso consta de cinco a siete estratos de células que rodean cámaras de aire; las células del estrato superior son ensanchadas y las del estrato inferior son aplanadas; Los cristales de oxalato de calcio se hallan libres en su interior (Machado, 1980).



**Figura 1. Hojas de *Erythroxylum coca* Lam.**  
Fuente. Tomado de Cortés, 2005.

**2.3.5.4. Distribución geográfica.** *Erythroxylum coca* Lam, en el quehacer farmacéutico es conocida como coca “Huánuco” o “Boliviana”, es ampliamente cultivada desde el sur de Ecuador, los valles tropicales de los Andes Peruanos hasta Bolivia (Plowman, 1980).

### 2.3.6. *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron

**2.3.6.1. Clasificación sistemática.** Según el Sistema de Clasificación de A. Cronquist (1988), la especie vegetal estudiada y clasificada tiene la siguiente posición (ver Anexo 2):

<b>DIVISIÓN</b>	: Magnoliophyta
<b>CLASE</b>	: Magnoliopsida
<b>SUB. CLASE</b>	: Rosidae
<b>ORDEN</b>	: Linales
<b>FAMILIA</b>	: Erythroxylaceae
<b>GÉNERO</b>	: <i>Erythroxylum</i>
<b>ESPECIE</b>	: <i>Erythroxylum novogranatense</i> (Morris) Hieron

**Sinonimia vulgar** : “Coca”

**2.3.6.2. Características morfológicas.** *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron, es morfológicamente similar a *Erythroxylum novogranatense* var. *Truxillense* (Rusby) Plowman “Coca de Trujillo”; debido a que es una variedad de la especie colombiana. Es un arbusto de 1 a 3 m de altura, presenta hojas membranosas, verde intenso, elípticas y de ápice agudo, mide de 1,8 a 4,8 cm de largo y 0,5 a 2,5 cm de ancho, las líneas laterales son prominentes en el envés. Las flores son pequeñas de 5 mm de largo, con pétalos de color blanco o crema, los frutos son drupas anaranjadas, de 6 a 10 mm de largo por 4 a 5 mm de ancho (Machado, 1980).

**2.3.6.3. Anatomía foliar: sección transversal de la hoja.** Tiene un grosor que varía entre 100 a 130  $\mu\text{m}$ , la epidermis superior formada por un solo estrato de células de forma variable; desde las tangencialmente alargadas hasta las casi cuadradas, llevando una cutícula delgada sobre la superficie libre. Las células de la epidermis inferior son células semejantes a las células de la epidermis superior, con papilas bien desarrolladas; el parénquima en empalizada son uniformes en cuanto a

altura y ancho, el parénquima esponjoso consta de tres a seis estratos de células, siendo las células del estrato superior del parénquima aplanadas y las células del estrato inferior isodiamétricas. Los cristales de oxalato de calcio son particularmente abundantes en las células de este parénquima (Machado, 1980).



**Figura 2. Hojas de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron. Fuente.** Tomado de Cortés, 2005.

**2.3.6.4. Distribución geográfica.** La especie *Erythroxylum novogranatense* var. *Truxillense* “Coca de Trujillo”, se cultiva en la costa desértica de Perú, cerca de la ciudad de Trujillo y en las estribaciones andinas adyacentes. También existen numerosas plantaciones en el valle seco superior del Marañón, el cual se parece a la costa Peruana. Es tolerante a la sequedad y resiste prolongadas sequías (Plowman, 1980).

## **2.4. Usos en la medicina tradicional**

El uso de la hoja de coca es una tradición andina, cuyo uso ritual se remonta a más de 40 siglos, los Incas la llamaban “hoja sagrada” por sus virtudes curativas. En la región andina del Perú se siguen utilizando en

forma de “chaccheo”, infusión, mate, emplastos, y cataplasmas. Tiene propiedades anestésicas, antiespasmódicas, tónicas, digestivas, sudoríficas y antidiarreico, las hojas machacadas o del chaccheo, se usan contra picaduras de arácnidos e insectos, en infusión para el mal de altura o soroche, cansancio y fatiga. Se le atribuye propiedades nutritivas por la presencia de vitamina A, complejo B y vitamina E, así como de nutrientes como calcio, fosforo, hierro, zinc, magnesio, potasio, etc. (Collazos, Urquieta y Alvistur, 1965; Well, 1978; Aguilar, 2006; Brack, 2011; Mostacero y col., 2011).

## 2.5. Composición química

La composición química de la hoja de coca no es uniforme, ya que está en función a diversos factores intrínsecos y extrínsecos. Entre los factores intrínsecos destacan el estado de las hojas (secos o frescos), edad de la planta, la identidad de las variedades; y como factores extrínsecos las zonas geográficas, la forma, época de cultivo y el medio ambiente principalmente (Brack, 2011).

Además, *Erythroxylum novogranatense* difiere marcadamente de *Erythroxylum coca* en que produce elevadas cantidades de salicilato de metilo en sus hojas y flores. *Erythroxylum coca*, por otro lado, tiene un olor muy diferente y único, parecido al heno, al te de china y a vainilla (Plowman, 1980).

## 2.6. Metabolitos primarios y secundarios

Los metabolitos primarios de la hoja de coca son las proteínas, carbohidratos y lípidos; y los metabolitos secundarios: los alcaloides, aceites esenciales, flavonoides, taninos y glicósidos. Los componentes principales son los alcaloides, destacándose entre ellos la cocaína; conteniendo *Erythroxylum coca* cv. *lambrán* (1,10 %), *Erythroxylum coca*



cv. *mollecoca* (0,86 %), *Erythroxylum coca* cv. *fusiforme* (0,60 %) y *Erythroxylum coca* cv. *ovoide* (0,63 %) (Machado, 1980). Siendo *Erythroxylum coca* cv. *lambrán*, la más utilizada en el chaccheo, en medicina tradicional y debido a su elevado contenido de cocaína es utilizado con fines ilícitos; en cambio *Erythroxylum novogranatense* var. *Truxillense* (Rugby) Plowman, es muy comercializada por su agradable olor, posee mayor cantidad de aceites volátiles, siendo utilizado como saborizante en la industria de bebidas gaseosas. La cocaína se halla en una cantidad promedio de 0,56 % (Soukup, 1970; Diaz, 1971; Castro, Chávez, 1995; Agapito *et al.*, 2004; Mostacero *et al.*, 2011).

### **2.6.1 Alcaloides**

Los alcaloides constituyen el grupo más grande de metabolitos secundarios de las plantas. Se encuentran en las semillas, raíces, cortezas y hojas; al estado libre o como glicósidos, o formando sales con ácidos orgánicos. Al año 1970 se reportaba alrededor de 5 000 estructuras de alcaloides aislados de aproximadamente 40 familias de plantas; al cabo de 1990 se reportaba alrededor de 7000 (Look, 1998).

La función de los alcaloides en las plantas aun no es muy conocida, como ocurre con la mayoría de los productos naturales, aunque se reporta que algunos intervienen como reguladores de crecimiento, o como repelentes o atrayentes de insectos; el hecho que aproximadamente el 80 % de las plantas no contienen alcaloides hace suponer que estos no son vitales para los organismos vivos. Sin embargo, por años, es conocida la acción fisiológica de muchos de ellos (Lock, 1998).

En la hoja de coca encontramos compuestos como la cocaína, cinamoilcocaína, metilecgonina, benzoilecgonina, ecgonina, norcocaína, N-formilnorcocaína, higrina, tropinona, *trans*-cinamoilcocaína, *cis*-cinamoilcocaína, cuscohigrina y tropacocaina (Johnson, Schmidt & Norman, 1998; Galindo y col., 2009; Unodc, 2016).

**2.6.1.1. Actividad antibacteriana de los alcaloides.** Los alcaloides criptolepina y quindolina de la planta de *Sida acuta*, reportaron actividad antibacteriana frente a los microorganismos gram positivos y gram negativos (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus carmonun*, *Bacillus cereus*, *Escherichia faecalis*, *Shiguella flexneri*, *Shiguella boydii*, *Shiguella dysenteriae*, *Salmonella thypi*, *Salmonella parathypi*, *Escherichia coli*, *Listeria innocua*), mediante el método de difusión en agar (Karou *et al.*, 2005).

Los extractos de alcaloides de las hojas de *Datura stramonium*: presentaron actividad antibacteriana *in vitro* contra *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*, usando el método de difusión en agar (Jasim *et al.*, 2015).

Los alcaloides yohimbina y vincamina (tipo indol), escopolamina y atropina (tipo tropano), colchicina (tipo tropolona), alantoína (tipo imidazolidina), trigonelina (tipo piridina), octopamina, sinefrina y capsaicina (tipo amina exocíclica); los derivados flavonoides quercetina, apigenina, genisteína, naringina, silimarina y silibinina; y los ácidos fenólicos (ácido gálico, ácido cafeico, ácido clorogénico y ácido quínico); mostraron actividad antibacteriana *in vitro* frente a las bacterias: *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Bacillus subtilis* (Ozcelik, Kartal & Orhan, 2011).

## **2.6.2. Flavonoides**

Los pigmentos flavonoides constituyen uno de los grupos más numerosos, conocidos algunas veces como antotaxinas, se desarrollan en casi todas las plantas superiores proporcionando protección ultravioleta y color a través de su complejidad fisiológica y ecológica (Look, 1998; Bruneton, 2001; Havsteen, 2002; Jager & Saaby, 2011; Kumar *et al.*, 2011).

La distribución de los flavonoides en el reino vegetal es muy diversa, pudiendo estar presente en casi todas las familias y géneros, se localizan en diferentes partes de la planta: los flavonoides hidrosolubles se ubican en vacuolas, epidermis o mesodermis de las hojas; en las células epidérmicas de las flores. Por otro lado, las geninas libres, geninas hidroxiladas y/o metiladas total o parcialmente, se ubican en la cutícula foliar y órganos secretores (Bruneton, 2001). Debido a su color y olor, atraen a los agentes polinizadores que contribuyen a la dispersión de las semillas; en las plantas superiores promueve el crecimiento (Havsteen, 2002; Jager *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2011).

Los flavonoides se encuentran generalmente en mezclas como agliconas y/o glicósidos, siendo este último el más común; en muchos casos, debido a la complejidad de la mezcla es más frecuente el estudio de estos componentes en forma de agliconas en extractos de plantas previamente hidrolizados. Antes de la absorción oral, los flavonoides se someten a desglicosilación ya sea por lactasa hidrolasa floridzina o citosólica  $\beta$ -glucocidase. La aglicona absorbida se conjuga a continuación, por metilación, sulfatación o glucuronidación, tanto las agliconas y los conjugados pueden pasar la barrera hematoencefálica. En el sistema nervioso central (SNC), varias flavonas se unen al sitio de benzodiazepinas en el receptor GABA que resulta en sedación, efectos ansiolíticos o anti-convulsivos. Los flavonoides de varias clases son inhibidores de la monoamina oxidasa A o B, trabajando de ese modo como antidepresivos o para mejorar las condiciones de los pacientes de Parkinson. Flavonoles, flavanonas y antocianidinas tienen efectos protectores que impiden los procesos inflamatorios que conducen a la lesión del nervio. Los flavonoides parecen capaces de influir en la salud y el estado de ánimo (Jager *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2011).

Los flavonoides se pueden dividir en varias clases en función a su estructura, siendo más comunes las flavonas y flavonoles, y más restringidas en su ocurrencia las isoflavonas, las chalconas y auronas. Al año 1990 se conocían alrededor de 3 000 flavonoides, entre ellos 450

flavonoides, 300 flavonas, 150 isoflavonas, 60 chalconas, 20 auronas, etc. (Look, 1998; Jager *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2011).

**2.6.2.1. Propiedades medicinales de los flavonoides.** Se ha reportado que poseen muchas propiedades, incluyendo actividad antiinflamatoria, actividad estrogénica, inhibición enzimática, actividad antimicrobiana (Havsteen, 1983; Harborne & Baxter, 1999; Middleton Jr. & Chithan, 1993), actividad vascular y actividad antitumoral citotóxica (Harborne & Williams, 2000). Para ser un grupo de compuestos de estructura relativamente homogénea, los flavonoides inhiben un número considerable de enzimas eucarióticas. En el caso de la inhibición enzimática, esto se ha postulado que podría deberse a la interacción de las enzimas con diferentes partes de la molécula del flavonoide (Havsteen, 1983).

La quercetina es uno de los flavonoides más estudiados y de mayor cantidad en los frutos de consumo humano, que ha demostrado reducir la presión sanguínea en modelos animales y en estudios de fase I a nivel clínico, se ha demostrado también que previene cambios morfológicos en corazón, riñón e hígado, también actúa previniendo el incremento de oxígeno reactivo que se asocia a la hipertensión (Pérez, Duarte, Jiménez, Santos & Osuna, 2009).

La mayoría de los flavonoides, expresan la capacidad de evitar la oxidación celular en los tejidos, así como reducir los niveles de radicales libres provenientes de la degradación lipídica por radiación o por la presencia de oxígeno reactivo, esta acción es un tratamiento en patologías tales como cáncer, próstata, envejecimiento epitelial entre otros, su mecanismo de acción no se ha determinado, pero básicamente se debe a la acción de hidroxilos libres presentes en los flavonoides y en los compuestos fenólicos; pudiendo estar presentes en las complejas estructuras de los extractos vegetales (Agusti *et al.*, 2009; Kang *et al.*, 2010).

Las frutas y verduras que tienen flavonoides, han sido reportadas como quimiopreventivo del cáncer, el consumo de cebolla o manzanas, dos de las principales fuentes de la quercetina, se asocia inversamente con la incidencia de cáncer de la próstata, pulmón, estómago y de mama. Además, los bebedores moderados de vino también parecen tener un menor riesgo de desarrollar cáncer del pulmón, endometrio, esófago, estómago y colon (Tapas, Sakarkar & Kakde, 2008; Kumar *et al.*, 2011).

**2.6.2.2. Actividad antibacteriana de los flavonoides.** Cada vez hay más reportes sobre la actividad antibacteriana de los flavonoides. Se han realizado muchas investigaciones en los extractos crudos de plantas *in vitro* para determinar su actividad antibacteriana. Extractos de las plantas de *Hypericum* (Dall'Agnol, Ferraz & Bernardi, 2003, *Capsella* y *Chromolaena* (El Abyad, Morsi, Zaki & Shaaban, 1990) ricos en flavonoides, se ha informado que poseen actividad antibacteriana. Muchas otras preparaciones fitoquímicas con alto contenido de flavonoides, se han reportado por presentar actividad antibacteriana (Tereschuk, Riera, Castro & Abdala, 1997; Park & Ikegaki, 1998). El propóleo también ha sido analizado en muchas ocasiones, y las muestras conteniendo altas concentraciones de flavonoides, frecuentemente reportan actividad antibacteriana (Hegazi, El Hady & Allah, 2000).

Se ha logrado aislar e identificar la estructura de los flavonoides que poseen actividad antibacteriana; entre ellos la apigenina (Sato, Suzaki, Nishikawa, Kihara & Shibata, 2000), galangina (Pepeljnjak & Kosalec, 2004); pinocembrina (Fukui, Goto & Tabata, 1988), ponciretina (Bae, Han & Kim, 1999)(Bae *et al.*, 1999); genkwanina (Cottiglia, Loy & Garau, 2001), sophoraflavanona G y sus derivados (Sakagami, Mimura & Kajimura, 1998), naringina y naringenina (Rauha, Remes & Heinonen, 2000), galato de epigallocatequina y sus derivados (Stapleton, Shah & Hamilton & Miller, 2004); luteolina y luteolina 7-glucósido (Sato *et al.*, 2000); quercetina, 3-*O*-metilquercetina y diversos

glucósidos de quercetina y kaempferol y sus derivados (Rauha *et al.*, 2000). También se han identificado con actividad antibacteriana a las flavonas (Alcaraz, Blanco, Puig, Tomas & Ferretti, 2000; Sato *et al.*, 1996); isoflavonas, flavanonas y chalconas (Chacha, Bojase & Majinda, 2005), isoflavanonas (Osawa, Yasuda & Maruyama, 1992), isoflavanos (Li, Asada & Yoshikawa, 1998), flavonoles (Simin, Ali, Khaliq Uz Zaman & Ahmad, 2002), glicósidos de flavonol (Faizi & Ali, 1999).

Algunos investigadores han informado de la sinergia entre flavonoides y otros agentes antibacterianos contra cepas de bacterias resistentes. Por ejemplo: epicatequina galato (Stapleton *et al.*, 2004) y sophoraflavanona G (Sakagami *et al.*, 1998). Al menos un grupo ha demostrado sinergia entre flavonoides con actividad antibacteriana (Arima *et al.*, 2002). Otros contienen flavonas naturales modificadas sintéticamente, determinándose su actividad antibacteriana (Stapleton *et al.*, 2004). También, complejando la 5-hidroxi-7,4-dimetoxiflavona con un número de metales de transición, se demostró el incremento de la actividad antibacteriana (Wang, Zhang, Feng & Li, 1992).

En un estudio realizado, la administración oral de 142,9 mg/kg de quercetina o 214,3 mg/kg de quercetrina protegieron a los conejillos de indias frente a una infección inducida por *Shigella*, muriendo los animales de control no tratados (Vijaya & Ananthan, 1996).

La inyección intraperitoneal de 1,58 mg/ kg sophoraisoflavona A o 3,16 mg/kg de 6,8-Diprenylgenisteina, protegieron significativamente a ratones inoculados con  $\sim 9,5 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias (UFC) de *Salmonella typhimurium* (Dastidar, Manna & Kumar, 2004).

Se evaluó la actividad antibacteriana de los flavonoides aislados de dos algas pardas libias denominadas *Cystoseira compressa* y *Padina pavonica*, frente a bacterias patógenas aisladas de carne, productos cárnicos, leche y productos lácteos: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus*, *Salmonella enterica* subespecie 1 serovar typhimurium y *Escherichia coli* O157. Todos estos aislamientos fueron

multifármacos resistentes con alto índice MAR (múltiple antibiotic resistance). Los resultados mostraron que el extracto de *C. compressa* mostró mayor actividad antibacteriana frente a las cepas aisladas sometidos a prueba, en comparación con el extracto de *P. pavonica* que mostró menor efecto positivo. Los flavonoides y las proantocianidinas contribuyeron significativamente a las propiedades antibacterianas (Alghazeer *et al.*, 2017).

Los extractos de las especies: *Hypericum*, *Capsella* y *Chromolaena*, poseen actividad antibacteriana, habiéndose encontrado flavonoides en su composición química. Asimismo, el uso de miel con propóleo mostró actividad antibacteriana. Las flavonas, flavona glucósidos, isoflavonas, flavanonas, isoflavanones, isoflavanos, flavonoles, glucósidos de flavonol y chalconas, también han reportado actividad antibacteriana. El mecanismo exacto de la acción antibacteriana de los extractos vegetales y sus derivados aún no está muy claro (Havsteen, 1983; Grande & Davey, 1990; Cushnie, 2005; Agusti *et al.*, 2009)

Cushnie (2005), refiere que diversas investigaciones científicas han tratado de dilucidar los mecanismos de acción de los flavonoides con propiedades antibacterianas. La actividad de la quercetina, por ejemplo, se ha atribuido al menos parcialmente a la inhibición de la ADN girasa. También se ha propuesto que la sophoraflavona G y (-) - epigallocatequina galato inhiben la función de la membrana citoplásmica, y que las licochalconas A y C inhiben la energía del metabolismo. Otros flavonoides cuyos mecanismos de acción han sido investigados incluyen la robinetina, la miricina, la apigenina, la rutina, la galangina, la 2,4,2-trihidroxi-5-metilchalcona y la lonchocarpol A.

El mecanismo de acción antibacteriana de los flavonoides (Cushnie, 2005), tiene como base las siguientes consideraciones:

- a. Inhibición de síntesis de ácidos nucleicos.
- b. Inhibición de la función de la membrana citoplasmática: mediante interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno

de los compuestos fenólicos a las proteínas de la membrana, seguido de la partición en la bicapa lipídica.

- c. Inhibición del metabolismo energético: mediante la destrucción de sistemas de transportes de electrones.

**2.6.2.3. Actividad antioxidante de los flavonoides.** La actividad antioxidante de los flavonoides depende de la disposición de los grupos funcionales sobre la estructura nuclear, la configuración, la sustitución, y el número de grupos cromóforos y auxocromos; influyen sustancialmente en varios mecanismos de la actividad antioxidante, tales como la propiedades quelantes del hierro y secuestradoras de radicales libres. La inhibición sobre determinadas oxidasas representa otro de los mecanismos a través de los cuales los flavonoides ejercen sus actividades antioxidantes (Kumar *et al.*, 2011; Herrera, 2014).

Los flavonoides también poseen actividad antioxidante, antihipertensiva, antiinflamatoria, disminuye el riesgo de cáncer de próstata, envejecimiento epitelial (Grande *et al.*, 1990; Havsteen, 2002; Agusti *et al.*, 2009; Kang *et al.*, 2010; Sivasothy *et al.*, 2013).

## 2.7. Determinación de la actividad antioxidante

La actividad antioxidante de un compuesto en fuentes vegetales, como plantas medicinales y alimentos, puede evaluarse *in vitro* por diversos métodos, como:

- a. Método de la captación del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH),
- b. Captación del radical libre anión superóxido y
- c. Método de captación de radicales hidroxilo.

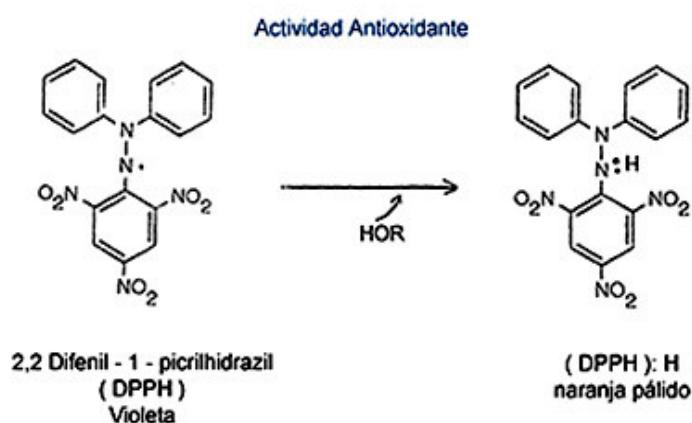


### 2.7.1. Método de la captación del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

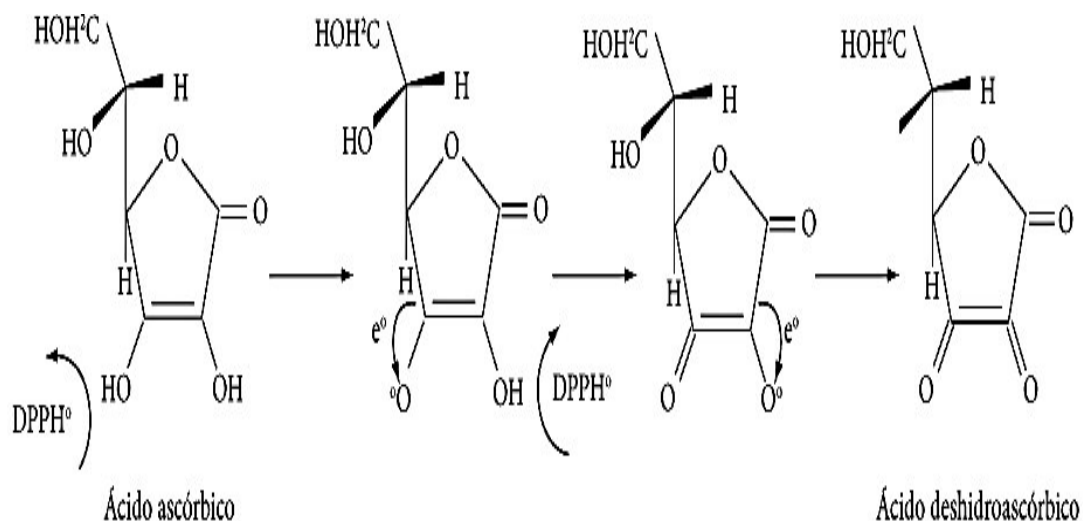
Es el método de neutralización del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). El DPPH es una sustancia que mide la capacidad de secuestro de cualquier compuesto con actividad antioxidante (Brand-Williams *et al.*, 1995; Chávez, Plaza y Lock, 1996).

El DPPH es un radical libre estable que presenta un color púrpura con absorbancia a 517 nm; las sustancias atraparoras de radicales libres (donadoras de hidrogeno) reaccionan con este compuesto y ocasionan la desaparición del color. La reacción es seguida midiendo la disminución de la absorbancia a 517 nm; el que se lee en el espectrofotómetro después de 20 a 30 min de reacción (Nenadis *et al.*, 2002).

Los resultados se pueden expresar como IC<sub>50</sub>, porcentaje de inhibición, porcentaje de actividad antiradicalaria o equivalentes al trolox o a ácido ascórbico. Se emplea como sustancia de referencia de captación de DPPH al trolox o a ácido ascórbico.



**Figura 3. Reducción del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil.** Fuente. Tomado de Brand-Williams *et al.*, 1995.



**Figura 4. Mecanismo de reacción del ácido ascórbico frente al radical DPPH evaluado mediante simulación computacional con el software Hyperchem 6,01. Fuente.** Tomado de Villanueva y col., 2010.

## 2.8. Determinación de la actividad antibacteriana

Los métodos para evaluar la actividad antibacteriana se clasifican principalmente en:

- a. Métodos de difusión,
- b. Métodos de dilución,
- c. Bioautografía y
- d. Análisis conductimétrico, el cual detecta el crecimiento microbiano como un cambio en la conductividad eléctrica o impedancia del medio de cultivo (Sawai, Doi, Maekawa, Yoshikawa & Kojima; 2002).

### **2.8.1. Métodos de difusión**

Las técnicas de difusión han sido ampliamente usadas para evaluar extractos de plantas con actividad antimicrobiana y presenta la ventaja de que sus resultados son altamente reproducibles (Freixa *et al.*, 1998).

La técnica está basada en el método originalmente descrito por Bauer *et al.* (Método de Kirby-Bauer). Este método de difusión en agar (en disco o en pozo) fue estandarizado y es actualmente recomendado por el Subcomité de Ensayos de Susceptibilidad de NCCLS, de Estados Unidos. El fundamento de esta determinación es establecer, en forma cuantitativa, el efecto de un conjunto de sustancias, ensayados individualmente, sobre las cepas bacterianas aisladas de procesos infecciosos.

El método se basa en la relación entre la concentración de la sustancia necesaria para inhibir una cepa bacteriana y el halo de inhibición de crecimiento en la superficie de una placa de agar con un medio de cultivo adecuado y sembrado homogéneamente con la bacteria a ensayar y sobre la cual se ha depositado un disco de papel filtro de 6 mm de diámetro, o se ha sembrado en pozo impregnado con una cantidad conocida de la sustancia (Hacek, Dressel & Peterson, 1999).

A continuación se procede a su incubación a la temperatura adecuada por 24 h (Mbata, Debiao & Saikia, 2008), luego se mide el halo de inhibición y se comparan los efectos de la sustancia sobre el microorganismo estudiado, con el antibiótico control. La lectura de los resultados representa la actividad *in vitro* de la sustancia (Tepe, Daferera, Sökmen, Polissiou & Sokmen, 2004).

Es necesario señalar que el tamaño del halo de inhibición es influenciado por varios factores, entre ellos; medio de cultivo en que se realiza la prueba, capacidad de difusión del compuesto, cantidad de inóculo, tiempo de generación del microorganismo, sensibilidad al antibiótico, y período de incubación (Stella y Marín, 2009).

## **2.9. Determinación de toxicidad**

### **2.9.1. Bioensayo de toxicidad mediante el método de la *Artemia salina***

La *Artemia salina*, es un crustáceo diminuto de cuerpo blando, comúnmente comercializado como quiste en tiendas de mascotas como alimento para peces; por lo tanto, ofrece ventajas como: disponibilidad, bajo costo, facilidad de almacenamiento, los ensayos pueden realizarse en cualquier momento y los requerimientos para este ensayo son mínimos. Este bioensayo también se utiliza para la detección de toxinas fúngicas, metales pesados, toxinas de cianobacterias, pesticidas, y en el ensayo de toxicidad de materiales dentales (Leos, Rivas y García, 2016).

Entre las pruebas biológicas, el bioensayo de la *Artemia salina* en la investigación fitoquímica como vía inicial de tamizaje citotóxico de extractos y productos aislados de plantas, ha demostrado ser útil, rápido, confiable, sencillo y de bajo costo; el procedimiento fue originalmente descrito por Michael *et al.* y fue adaptado por Meyer *et al.* como un útil bioensayo en la investigación química y biológica de productos naturales.

El fundamento de este ensayo se basa en la toxicidad de un extracto o compuesto de ser tóxico sobre las *Artemias* cultivadas en el laboratorio para determinar los valores de Concentración Letal Media (CL<sub>50</sub>), expresada en µg/mL (Meyer *et al.*, 1982; Cytel, 1995; Leos *et al.*, 2016).

## **2.10. Determinación de citotoxicidad**

### **2.10.1. Bioensayo de citotoxicidad en erizos de mar (*Tetrapygus niger*)**

El bioensayo de citotoxicidad en erizos de mar es un método utilizado por Castañeda (2003); Castro (2011) y Hernández (2015), que permite determinar la actividad citotóxica de diversos compuestos químicos,

utilizando para ello los embriones de erizos recientemente fecundados *in vitro*. También evalúa la genotoxicidad, embriotoxicidad y teratogenicidad de diferentes sustancias químicas.

## **CAPÍTULO III: METODOLOGÍA**

### **Lugar de ejecución**

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el Instituto de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales “Juan de Dios Guevara” y en el Centro de Producción, de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos; así como en el Instituto de Investigación “Antonio Raimondi” de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, durante los meses de enero 2016 a mayo de 2017.

### **3.1. Tipo de Investigación**

Experimental, longitudinal y prospectiva.

### **3.2. Material biológico**

#### **3.2.1. Hojas de *Erythroxylum coca* Lam y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron**

Fueron proporcionadas por la Empresa Nacional de la Coca S.A. La clasificación taxonómica de la planta fue realizada en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Constancia N° 07-USM-2013 y Constancia N° 08-USM-2013 (ver Anexo 1 y 2). Se procedió a la limpieza de la planta y separación de las hojas. Para el secado de las hojas se llevó a la estufa a una temperatura de 40 °C hasta



### **3.3. Materiales, reactivos, equipos**

#### **3.4.1. Material de laboratorio**

Algodón hidrófilo, balón de vidrio 1000 mL, Beacker Pyrex de 100 mL y 250 mL, bolsas de polipropileno incoloro 11 x 16 cm, cuba para cromatografía ascendente, cromatofolio de silica gel 60 F254, cubeta de cuarzo espectrofotométrica, matraz Erlenmeyer Pyrex 250 mL, mechero Bunsen, micropipeta 10 – 200  $\mu$ L, micropipeta 100 – 1000  $\mu$ L, micropipeta multicanal con 12 puntas de 10,0 – 100,0  $\mu$ L, papel aluminio, papel Whatman N°1, pipetas graduadas de vidrio de 2, 5 y 10 mL, placas Petri de vidrio 15 mm x 100 mm Pyrex, probeta de 100 mL, tips estériles de 100  $\mu$ L, 200  $\mu$ L y 1000  $\mu$ L, tubos de ensayo Pyrex 13 x 100 con tapa rosca, frascos viales de vidrio estériles 3 y 5 mL, con tapa de goma.

#### **3.4.2. Reactivos**

Ácido acético glacial p.a., ácido ascórbico p.a., ácido cítrico p.a., ácido clorhídrico 37 % p.a., ácido perclórico p.a., agua destilada p.a., carbonato de sodio solido p.a., ciprofloxacino clorhidrato estándar, cloroformo p.a., cloruro de aluminio p.a., cloruro férrico, cloruro de sodio 0,85 %, dimetilsulfóxido (DMSO), 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), etanol 96° GL p.a., éter dietílico p.a., fosfato de sodio p.a., gentamicina sulfato estándar, hidróxido de sodio p.a., hidróxido de amonio p.a., metanol grado espectroscópico, n-butanol p.a., nitrito de sodio p.a., reactivo cristal violeta Merck, reactivo de Dragendorff solución de pulverización Merck, sulfato de sodio p.a., verde de bromocresol.

#### **3.4.3. Equipos**

Autoclave marca Fravill, balanza analítica de precisión marca Ohaus Analytical plus sensibilidad 0,1 mg, cabina de flujo laminar vertical marca



Baker Company, campana extractora de aire marca Forniteir Junior, contador Coulter Counter, espectrofotómetro ultravioleta-visible marca Helios Zeta, estereoscopio marca Belnet, estufa de incubación marca Memmert, evaporador rotatorio con baño maría, homogeneizador marca Vortex Mixer VM300, incubadora marca Biochemical Incubator ZSD-1090, lámpara de luz ultravioleta, lectora de microplacas marca Bio-Rad, liofilizador, microondas marca Miray, Oven, microscopio invertido de contraste de fases marca Diavert, molino de cuchillas N° 22, refrigeradora.

#### **3.4.4. Medios de cultivo**

Agar Tripticasa Soya (TSA) Merck, Caldo Müller-Hinton (CMH) Merck, Caldo Tripticasa Soya (TSB) Merck.

### **3.5. Determinación de metabolitos secundarios de las hojas de *Erythroxylum coca* Lam y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron**

#### **3.5.1. Recolección y selección de las hojas de *Erythroxylum coca* Lam y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron**

Un peso aproximado de 10 kg de hojas frescas de *Erythroxylum coca* Lam y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron, fueron proporcionadas por la Empresa Nacional de la Coca S.A., provenientes de la provincia de Trujillo, departamento de La Libertad; y del distrito de Samugari (Palmapampa), provincia de La Mar, departamento de Ayacucho.

#### **3.5.2. Obtención de extractos etanólicos de las hojas de *Erythroxylum coca* Lam y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron**

Los extractos fueron obtenidos a partir de las hojas secas y pulverizadas de las especies de coca seleccionadas, se utilizaron 500 g de muestra en

polvo y 3 L de etanol 96° GL, se maceraron por 10 días en frascos de color ámbar y después se filtraron; para realizar el *screening* fitoquímico se separaron un volumen aproximado de 20 mL de cada extracto, los filtrados restantes fueron sometidos a corriente de aire caliente circulante mediante una estufa a 37 °C por 7 días. Removido el etanol, se procedió a almacenar los extractos secos en frascos viales y refrigerarlos a una temperatura de 8 °C (Lock de Ugaz, 1998). A los extractos etanólicos se les cuantificó alcaloides y flavonoides totales; asimismo, se determinó su actividad antioxidante, actividad antibacteriana, actividad tóxica y actividad citotóxica.

### **3.5.3. *Screening fitoquímico del extracto etanólico de las hojas de Erythroxylum coca Lam y Erythroxylum novogranatense (Morris) Hieron***

Se procedió a realizar las diferentes reacciones químicas de identificación, mediante cambios de coloración o formación de precipitados, para determinar la presencia de metabolitos secundarios; para lo cual se partió de un extracto etanólico y con los ensayos correspondientes a cada uno: alcaloides (*Dragendorff y Mayer*), fenoles (cloruro férrico), flavonoides (*Shinoda y amoniaco*), esteroides (*Liebermann-Burchard*), quinonas (*Bornträger*), saponinas (*espuma*), taninos (*gelatina*); 5 mg de extracto problema con cinco gotas de reactivo.

### **3.5.4. *Remoción de clorofila del extracto etanólico de las hojas de Erythroxylum coca Lam y Erythroxylum novogranatense (Morris) Hieron***

Se realizó con el objetivo de separar las interferencias que genera la clorofila en los bioensayos. Mediante un método de ácido-base se logró remover la clorofila.

Para lograr la remoción de la clorofila las muestras liofilizadas fueron disueltas en 10 ml de agua y tratadas con ácido clorhídrico hasta pH 2. Se extrajo con 3 x 10 mL con éter dietílico. Conteniendo la fase acuosa los alcaloides, flavonoides y fenoles, y la fase orgánica la clorofila.

**3.5.5. Extracción y aislamiento de alcaloides totales del extracto etanólico de las hojas de *Erythroxylum coca* Lam y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron**

Se realizó según el método aplicado por Turner, Ma & Elsohly (1981), la capa acuosa, procedente de la remoción de la clorofila, se ajustó a pH 12 con hidróxido de sodio 1 N. Se realizó una segunda extracción con 3 x 15 mL de cloroformo. La capa acuosa contendrá fenoles y flavonoides totales; mientras que el residuo clorofórmico, el cual contiene los alcaloides totales, se secó con sulfato de sodio sólido y se concentró dejándolo en campana de extracción hasta sequedad, quedando un residuo incoloro y viscoso. Se realizó una prueba rápida con el reactivo de Dragendorff para corroborar la presencia de alcaloides.

Se agregó 5 mL de cloroformo, se dividieron en 5 frascos viales a razón de 1 mL y se concentró en campana extractora (1 frasco vial para cada bioensayo).

Se usó la técnica de cromatografía en capa fina (CCF) bajo las siguientes condiciones:

**Fase estacionaria**

Cromatofolio de sílica gel 60 F254

**Fase móvil**

Metanol: hidróxido de amonio (100:1,5) v/v

**Revelador**

Reactivo de Dragendorff solución de pulverización Merck

## **Detección**

Zonas rojo ladrillo a la luz visible.

### **3.5.6. Cuantificación de alcaloides totales del extracto etanólico de las hojas de *Erythroxylum coca* Lam y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron**

Se realizó la cuantificación de los alcaloides totales siguiendo el método recomendado por la United States Pharmacopeia (USP 34-2011). Se disolvió 600 mg de muestra (extracto crudo) en 50 mL de ácido acético glacial, se agregó una gota de cristal violeta y se valoró con ácido perclórico 0,1 N hasta el viraje a color verde. Cada mL de ácido perclórico 0,1 N equivale a 30,34 mg de cocaína.

### **3.5.7. Extracción y aislamiento de flavonoides totales del extracto etanólico de las hojas de *Erythroxylum coca* Lam y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron**

Se procedió según Nagai (2012), la capa acuosa, procedente de la remoción de la clorofila, se ajustó a pH 12 con hidróxido de sodio 1 N. Se realizó una segunda extracción con 3 x 15 mL de cloroformo. La capa acuosa contendrá fenoles y flavonoides totales. La capa etérea con los alcaloides, se separó, y la capa acuosa rica en compuestos fenólicos y flavonoides, se ajustó a pH 5 con ácido clorhídrico 1 M, se filtró y colocó bajo campana de extracción para eliminar algún remanente de solvente. Se realizó la prueba de Shinoda para corroborar la presencia de flavonoides. Finalmente las muestras fueron liofilizadas.

Se procedió a la separación mediante cromatografía descendente en papel bajo las siguientes condiciones:

#### **Fase estacionaria**

Papel Whatman N° 1 de 11 x 45 cm

### **Fase móvil**

Sistema de solvente BAW (n-butanol: ácido acético: agua 4: 1: 5 v/v) el cual se preparó el día anterior, utilizándose la fase superior. El desarrollo se efectuó en una cámara de desarrollo cromatográfico (sistema descendente).

### **Revelador**

Luz ultravioleta y vapores de amoníaco.

Se procedió a la identificación de los flavonoides aislados con la reacción de Shinoda.

### **Espectrofotometría UV**

Se determinó el espectro ultravioleta de las fracciones de flavonoides obtenidas mediante barrido.

## **3.6. Bioensayo de toxicidad de alcaloides totales del extracto etanólico de las hojas de *Erythroxylum coca* Lam y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron mediante el método de la *Artemia salina***

Se siguió el método recomendado por Cyted (1995). La *Artemia salina* Leach, es un crustáceo cuyas larvas (nauplios) son sensibles a una gran variedad de sustancias, por lo que puede medirse fácilmente la bioactividad de extractos vegetales y servir para dirigir el fraccionamiento bioguiado en forma rápida y simple. El procedimiento fue originalmente descrito por Michael *et al* adaptado en 1982 por Meyer *et al.*, desarrollando un bioensayo para la determinación de toxicidad con la utilización de la *Artemia salina*. El método se caracterizó por su rapidez, confiabilidad y bajo presupuesto para su ejecución. Es utilizado como vía inicial de tamizaje tóxico de extractos vegetales para discriminar aquellas muestras de elevada toxicidad, debido a que presenta buena correlación con la toxicidad *in vitro* (Meyer *et.al.*; 1982; Roig, 1988; Cyted, 1995; Martínez, 2005).

## Procedimiento

El agua de mar fue preparada oxigenando por 1 h, el primer día se agregó 50 mg de huevos de *Artemia salina*, una gota de suspensión de levadura (3 mg de levadura en 5 mL de agua marina) en 350 mL de agua de mar (38 g de sal marina para 1 L de agua), se colocó en un lugar con luz permanente y bombeo de oxígeno con burbujeo lento.

120 mg de alcaloides totales aislados de hojas de *Erythroxylum coca* Lam, se disolvieron en 1,5 mL de DMSO (dimetilsulfóxido) y en 4,5 mL de agua destilada. Obteniéndose la solución madre de 20 mg/mL, se prepararon diluciones de 4000, 2000, 1000, 200, 100 y 20 ppm, transfiriéndose para ello a cada frasco vial 1000, 500, 250, 50, 25 y 5  $\mu$ L de la solución madre; respectivamente. Se emplearon 5 frascos viales por cada concentración (30 en total) más 6 frascos viales de control con 50  $\mu$ L de DMSO. En cada frasco vial se colocaron 10 nauplios y la dilución de alcaloides, agregando agua de mar hasta 5 mL por vial, adicionándose una gota de levadura como alimento. Después de 24 h se contaron y anotaron el número de sobrevivientes en cada dilución.

240 mg de alcaloides totales aislados de hojas de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron, se disolvieron en 7,5 mL de DMSO (dimetilsulfóxido) y en 2,5 mL de agua destilada. A partir de esta solución, se prepararon diluciones de 6000, 4800, 2400, 1200, 240, 120 y 24 ppm, transfiriéndose a cada frasco vial 1250, 1000, 500, 250, 50, 25 y 5  $\mu$ L de la solución madre; respectivamente. Se emplearon 5 frascos viales por cada concentración (35 en total) más 7 frascos viales de control con 50  $\mu$ L de DMSO. En cada frasco vial se colocaron 10 nauplios y la dilución de alcaloides requeridos, agregando agua de mar hasta 5 mL por frasco vial, adicionándose una gota de levadura como alimento. Después de 24 h se contaron y anotaron el número de sobrevivientes en cada dilución.

Finalmente, se clasificaron los alcaloides aislados evaluados según la toxicidad, tomando como referencia las recomendaciones del Cytod.

Se determinó la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) usando la función Probit y el paquete de datos estadísticos IBM SPSS Statistics 23.0

### **3.7. Actividad antioxidante de los flavonoides totales del extracto etanólico de las hojas de *Erythroxylum coca* Lam y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron mediante el ensayo de DPPH**

En esta investigación, para evaluar la actividad antioxidante de los flavonoides totales, se utilizó el método realizado por Brand-Williams *et al.* (1995), que consiste en la captación del radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH), expresado como IC<sub>50</sub> (µg de extracto etanólico/mL). Para ello se preparó una solución de DPPH al 2 % en metanol.

En el caso de las muestras, para los flavonoides de *Erythroxylum coca* Lam se trabajó con 3000, 2000, 1500, 1000 y 500 µg/mL y para los flavonoides de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron se trabajó con 1000, 750, 500, 250, 125 µg/mL. Se leyó en un espectrofotómetro de UV-Vis a 517 nm. Todas las pruebas se realizaron por cuadruplicado.

Se calculó el porcentaje de actividad antioxidante de cada muestra de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\%AA = 100 - \left\{ \frac{(Am - Ab)100}{Acontrol} \right\}$$

Donde,

*% AA* : Porcentaje de actividad antioxidante  
*Am* : Absorbancia de la muestra  
*Ab* : Absorbancia del blanco  
*Acontrol* : Absorbancia del reactivo DPPH

La concentración de los flavonoides aislados que neutralizan al 50 por ciento de los radicales de DPPH (IC<sub>50</sub> concentración efectiva media) se obtiene de la recta obtenida al graficar el porcentaje de actividad versus la concentración de la muestra (µg/mL), expresado en IC<sub>50</sub>.

### **3.8. Determinación de la actividad antibacteriana *in vitro* de los alcaloides y flavonoides totales del extracto etanólico de las hojas de *Erythroxylum coca* Lam y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron**

#### **3.8.1. Método de difusión en agar**

##### ***Fundamento***

Es la inhibición del crecimiento bacteriano, mediante la difusión de las sustancias activas en un medio de cultivo sólido, que se evidencia con la formación de halos de inhibición (Sarker, Nahar & Kumarasamy, 2007).

##### ***Bacterias (cepas clínicas)***

Gram positivas:    *Staphylococcus aureus*  
                              *Staphylococcus epidermidis*  
Gram negativas:    *Escherichia coli*  
                              *Pseudomona aeruginosa*

##### ***Muestras***

Alcaloides y flavonoides totales de *Erythroxylum coca* Lam y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron; disueltos en 1,5 mL de agua destilada y 0,5 mL de DMSO.

##### ***Preparación de la suspensión del inóculo***

Los cultivos de microorganismos de prueba fueron reactivados en solución de cloruro de sodio al 0,85 %.

##### ***Preparación de las placas***

Se utilizó agar Müller-Hinton; previamente reconstituido, esterilizado, enfriado y mantenido a 45 °C.



### ***Inoculación e incubación de la muestra***

Se procedió a colocar 400 µL de alcaloides y flavonoides totales de *Erythroxylum coca* Lam y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron.

### ***Control negativo***

Agua destilada más DMSO.

### ***Control positivo***

Ciprofloxacino 10 µg y gentamicina 5 µg.

### ***Lectura e interpretación de los resultados***

La lectura de los halos de inhibición del crecimiento, se realizó mediante el registro de los diámetros de estos en mm.

## **3.9. Bioensayo de citotoxicidad de los extractos crudos de *Erythroxylum coca* Lam y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron en erizos de mar (*Tetrapygus niger*)**

El bioensayo se realizó usando huevos fecundados provenientes de 10 erizos de mar (*Tetrapygus niger*), las que fueron colectadas en las playas de Ancón, ubicada a 43 km al norte de Lima, y trasladadas en agua de mar entre 10 y 15 °C. Se utilizó la técnica estandarizada por el Instituto de Investigación “Antonio Raimondi” de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

### ***3.9.1. Obtención de gametos***

Se colocaron los erizos adultos en placas Petri, se abrió cuidadosamente al erizo por la parte dorsal, con ayuda de una tijera de disección, cortando en circunferencia, para no dañar los gametos. El sexo del animal se determinó al observar el color de los gametos. Los óvulos de *Tetrapygus*

*niger* son de color granate y el esperma es cremoso. Se extrajeron los racimos de óvulos de tres erizos hembras con ayuda de una pinza limpia, y se colocaron en un Beaker una solución de 500 mL de agua de mar fría hasta que se tiñeran de un color púrpura, las gónadas se agitan suavemente para lograr su liberación. Se lavaron los ovocitos y se decantó el agua sobrenadante con la finalidad de eliminar el tejido celómico y restos internos que se encontraban adheridos a los mismos, reemplazándola con agua de mar fresca, doblemente filtrada, hasta 250 mL, después de lo cual se procedió a lavarlos decantando el agua sobrenadante con la finalidad de eliminar el tejido celómico y restos internos que se encontraban adheridos a los mismos, reemplazándola con agua de mar fresca, tres veces filtrada, para luego completar la solución a 250 mL.

Los ovocitos lavados están listos para la fertilización. Los espermatozoides a diferencia de los huevos, son viables sólo por un tiempo limitado en agua de mar. En una placa Petri se colocan las gónadas masculinas de los erizos para evitar que se activen antes de alcanzar los ovocitos.

### **3.9.2. Fertilización**

Se agregaron unas gotas de espermatozoides con ayuda de una pipeta Pasteur, evitando posibles contaminaciones, sobre el Beaker que contenía la suspensión de óvulos lavados listos para ser fecundados. Se agitó cuidadosamente los espermatozoides y los óvulos con una pipeta Pasteur para que ocurra la fecundación. Posteriormente se transfirió una muestra de la suspensión de óvulos y espermatozoides a una lámina portaobjeto. Se colocó un cubreobjetos y se observó al microscopio compuesto a 40X. La observación del óvulo formándose la membrana de fertilización rodeada de espermatozoides, lo cual evita la polispermia, significó que el procedimiento de fertilización se realizó en condiciones óptimas.

### **3.9.3. Preparación del extracto**

Para realizar el ensayo de citotoxicidad, los extractos crudos de *Erythroxylum coca* Lam y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron; se prepararon a concentraciones de 10 µg/mL, 100 µg/mL y 1000 µg/ mL. Se realizó la fecundación y se prepararon 3 frascos viales por muestra, con 3 mL de agua de mar con huevos fecundados y 20 µL de muestra problema.

Se marcaron los frascos viales con las concentraciones respectivas para cada una de las fracciones. Se dejó como control el Beaker con los óvulos fecundados a 15 °C en un agitador que permitirá la oxigenación del sistema. Los frascos viales con las diferentes concentraciones de extracto y los controles se colocaron en una incubadora a baja temperatura sobre una plataforma (agitador mecánico) con oxigenación permanente.

Se realizaron observaciones a las 24 y 48 h de haberse producido la fecundación:

Luego de 24 h se observó cada uno de los frascos viales con la ayuda de un microscopio compuesto, visualizándose en que estadio de desarrollo se encontraron los óvulos fecundados.

## CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Resultados

#### 4.1.1. Principales metabolitos secundarios de las hojas de *Erythroxylum coca* Lam y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron

De acuerdo al *screening* fitoquímico de las hojas de coca estudiadas, el grupo de alcaloides, flavonoides, fenoles, saponinas y taninos, están presentes en su totalidad; no se observó presencia de esteroides y quinonas (ver tabla 1 y 2).



**Figura 5.** Screening fitoquímico del extracto etanólico de las hojas de (A) *Erythroxylum coca* Lam y (B) *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron. Fuente. Elaboración propia, marzo 2016.

**Tabla 1. Screening fitoquímico del extracto etanólico de las hojas de *Erythroxylum coca* Lam**

Sustancia ensayada	Metabolito	Reacción	Resultados
Extracto etanólico de las hojas de <i>Erythroxylum coca</i> Lam	Alcaloides	Dragendorff	+++
		Mayer	+++
	Fenoles	Cloruro férrico	+
	Flavonoides	Shinoda	++
		Amoniaco	++
	Esteroides y quinonas	Liebermann-Burchard	-
		Bornträger	-
	Saponinas	Espuma	+++
	Taninos	Gelatina	+++

Leyenda: muy abundante (+++), abundante (++), escaso (+), ausencia (-)

Fuente. Elaboración propia, marzo 2016.

**Tabla 2. Screening fitoquímico del extracto etanólico de las hojas de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron**

Sustancia ensayada	Metabolito secundario	Reacción	Resultados
Extracto etanólico de las hojas de <i>Erythroxylum novogranatense</i> (Morris) Hieron	Alcaloides	Dragendorff	++
		Mayer	++
	Fenoles	Cloruro férrico	++
	Flavonoides	Shinoda	+++
		Amoniaco	+++
	Esteroides y quinonas	Bornträger;	-
		Liebermann-Burchard	-
	Saponinas	Espuma	+
	Taninos	Gelatina	+

Leyenda: muy abundante (+++), abundante (++), escaso (+), ausencia (-)

Fuente. Elaboración propia, marzo 2016.

#### 4.1.2. Extracción y aislamiento de los metabolitos del extracto etanólico de las hojas de *Erythroxylum coca* Lam y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron

**Tabla 3.** Contenido de alcaloides y flavonoides totales del extracto etanólico de las hojas de *Erythroxylum coca* Lam y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron

Extracto etanólico	Alcaloides totales	Flavonoides totales
<i>Erythroxylum coca</i> Lam	70 - 80 mg/g	590 mg/g
<i>Erythroxylum novogranatense</i> (Morris) Hieron	95 - 00mg/g	610 mg/g

Fuente. Elaboración propia, marzo 2016.

#### 4.1.3. Perfil cromatográfico de los alcaloides totales del extracto etanólico de las hojas de *Erythroxylum coca* Lam y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron

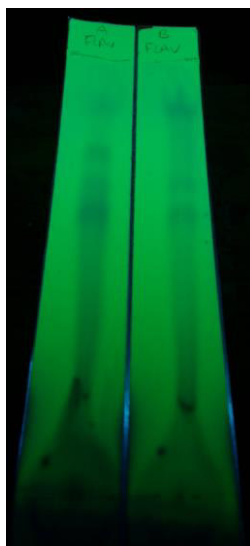
**Tabla 4.** Cromatograma de los alcaloides totales del extracto etanólico de las hojas de *Erythroxylum coca* Lam y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron y Rf de sus metabolitos

Especie	Cocaína Rf	Benzoilecgonina Rf
<i>Erythroxylum coca</i> Lam	0,60	0,30
<i>Erythroxylum novogranatense</i> (Morris) Hieron	0,66	0,30

Fuente. Elaboración propia, marzo 2016.



**Figura 6.** Cromatograma en capa fina de los alcaloides cocaína y benzoilecgonina, aislados del extracto etanólico de las hojas de (A) *Erythroxylum coca* Lam y (B) *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron. *Fuente.* Elaboración propia, marzo 2016.



**Figura 7.** Cromatograma en capa fina de los flavonoides totales aislados del extracto etanólico de las hojas de (A) *Erythroxylum coca* Lam y (B) *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron; se observan siete bandas, identificándose la presencia de chalconas y flavonoles para ambas especies. *Fuente.* Elaboración propia, marzo 2016.

**4.1.4. Cuantificación de alcaloides totales del extracto etanólico de las hojas de *Erythroxylum coca* Lam y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron**

**Tabla 5. Porcentaje de alcaloides totales del extracto etanólico de las hojas de *Erythroxylum coca* Lam y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron**

Espece	%
<i>Erythroxylum coca</i> Lam	2,69
<i>Erythroxylum novogranatense</i> (Morris) Hieron	1,67

Fuente. Elaboración propia, marzo 2016.

**4.1.5. Bioensayo de toxicidad letal media de los alcaloides totales del extracto etanólico de las hojas de *Erythroxylum coca* Lam y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron; mediante el método de *Artemia salina*.**

**Tabla 6. Evaluación de toxicidad (CL<sub>50</sub>) de los alcaloides totales del extracto etanólico de las hojas de *Erythroxylum coca* Lam y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron; mediante el método de *Artemia salina*.**

Sustancia ensayada (alcaloides totales)	Concentración µg/mL	CL <sub>50</sub> (µg/mL)
<i>Erythroxylum coca</i> Lam	4 000	1 741,825
	2 000	
	1 000	
	200	
	100	
	20	
<i>Erythroxylum novogranatense</i> (Morris) Hieron	6000	1 647,459
	4800	
	2400	
	1200	
	240	
	120	
	24	

Fuente. Elaboración propia, junio 2016.



**Tabla 7. Clasificación de toxicidad según Cyted**

<b>I</b>	Extremadamente tóxico	1 - 10      µg /mL
<b>II</b>	Altamente tóxico	10 - 100    µg /mL
<b>III</b>	Moderadamente tóxico	100 - 500   µg /mL
<b>IV</b>	Ligeramente tóxico	500 - 1000   µg /mL
<b>V</b>	Prácticamente no tóxico	1000 - 1500   µg /mL
<b>VI</b>	Relativamente inocuo	> 1500      µg /mL

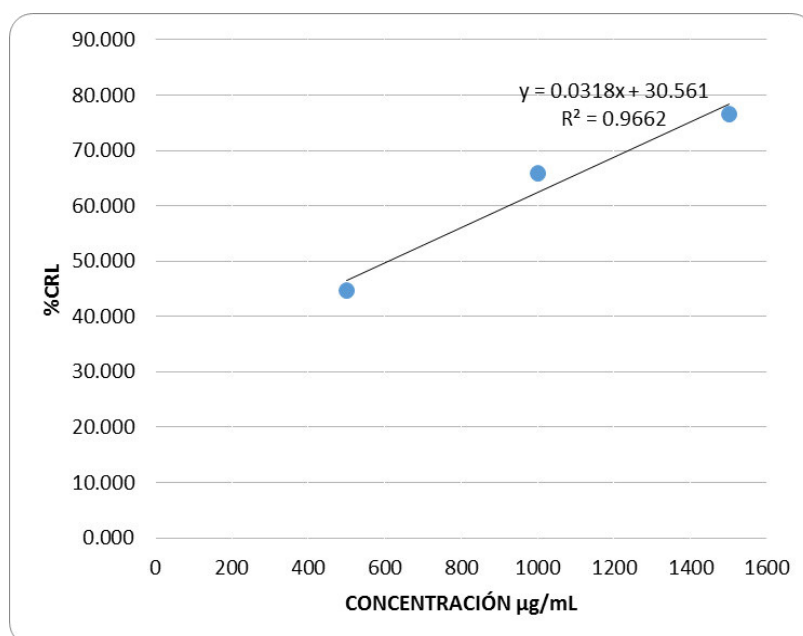
Fuente. Elaboración propia, junio 2016.

#### **4.1.6. Actividad antioxidante de los flavonoides totales del extracto etanólico de las hojas de *Erythroxylum coca* Lam y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron; mediante el ensayo de DPPH**

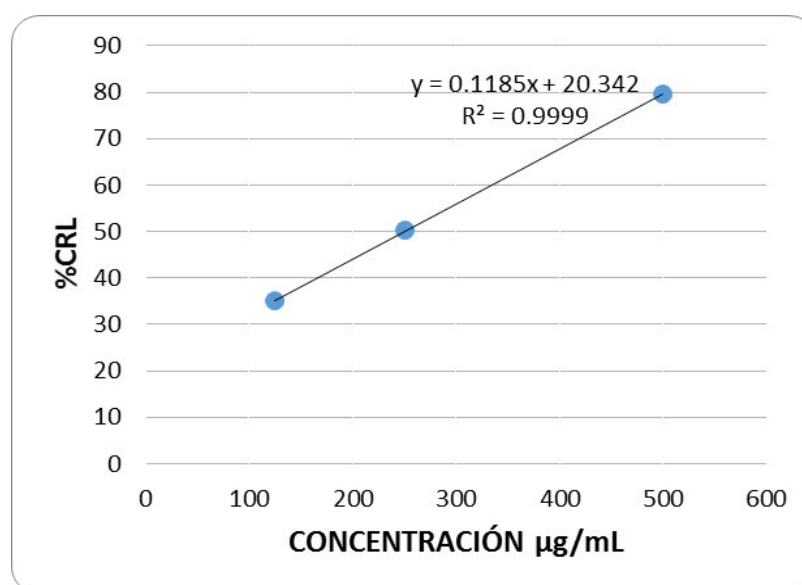
**Tabla 8. Actividad antioxidante de los flavonoides totales del extracto etanólico de las hojas de *Erythroxylum coca* Lam y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron; frente al radical DPPH**

Sustancia ensayada (flavonoides aislados)	Concentración µg/mL	Porcentaje de inhibición (%)	IC <sub>50</sub> µg/mL
<i>Erythroxylum coca</i> Lam	3 000	85,820	611,29
	2 000	81,737	
	1 500	76,615	
	1 000	65,850	
	500	44,766	
<i>Erythroxylum novogranatense</i> (Morris) Hieron	1 000	93,987	250,29
	750	92,353	
	500	79,510	
	250	50,260	
	125	34,967	

Fuente. Elaboración propia, setiembre 2016.



**Figura 8.** Curva de captación de DPPH de los flavonoides totales del extracto etanólico de las hojas de *Erythroxylum coca* Lam. *Fuente.* Elaboración propia, setiembre 2016.

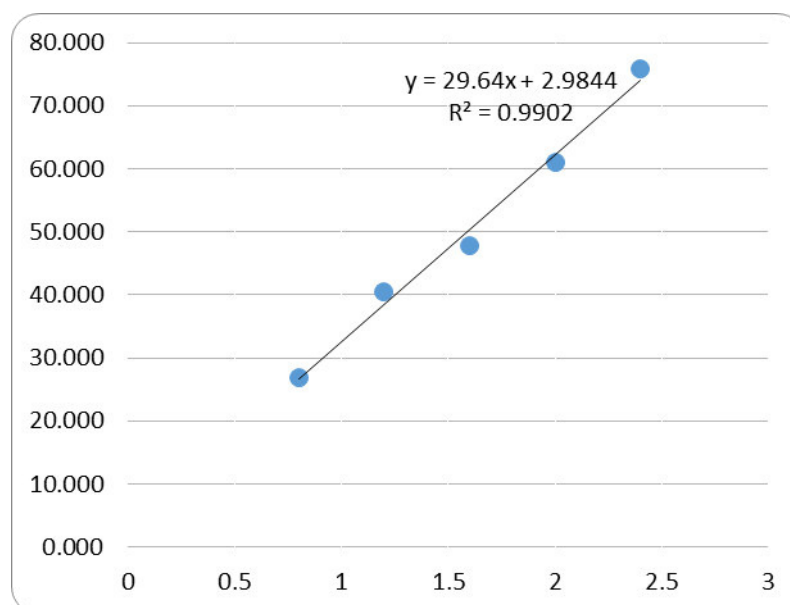


**Figura 9.** Curva de captación de DPPH de los flavonoides totales del extracto etanólico de las hojas de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron. *Fuente.* Elaboración propia, setiembre 2016.

**Tabla 9. Actividad antioxidante del ácido ascórbico frente al radical DPPH**

Porcentaje de captación de DPPH del ácido ascórbico	
Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Porcentaje de inhibición (%)
2,4	75,798
2,0	61,099
1,6	47,884
1,2	40,386
0,8	26,875

Fuente. Elaboración propia, setiembre 2016.



**Figura 10. Porcentaje de captación de radical DPPH del ácido ascórbico.** Fuente. Elaboración propia, setiembre 2016.

**4.1.7. Actividad antibacteriana por difusión en agar de los alcaloides y flavonoides totales del extracto etanólico de las hojas de *Erythroxylum coca* Lam y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron**

**Tabla 10.** Halos de inhibición en agar Müller-Hinton de los alcaloides y flavonoides totales del extracto etanólico de las hojas de *Erythroxylum coca* Lam

Sustancia ensayada (400 µL)	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomona aeruginosa</i>
Alcaloides (40 mg/mL)	---	25 mm	18 mm	26 mm
Flavonoides (0,5 g/mL)	21 mm	26 mm	20 mm	28 mm

(---) No presenta actividad

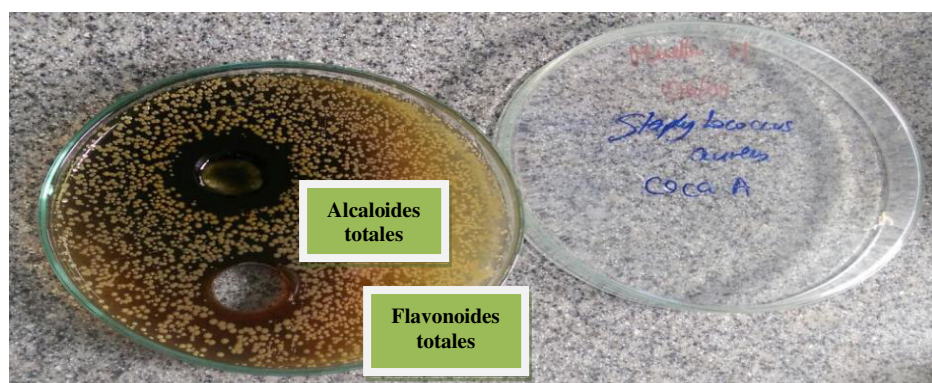
Fuente. Elaboración propia, diciembre 2016.

**Tabla 11.** Halos de inhibición en Agar Müller-Hinton de los alcaloides y flavonoides totales del extracto etanólico de las hojas de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron

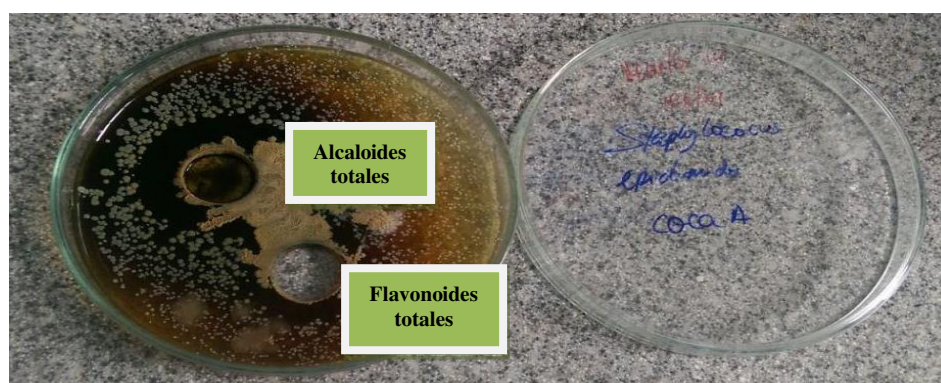
Sustancia ensayada (400 µL)	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomona aeruginosa</i>
Alcaloides (40 mg/mL)	20 mm	23 mm	22 mm	---
Flavonoides (0,5 g/mL)	23 mm	35 mm	20 mm	20 mm

(---) No presenta actividad

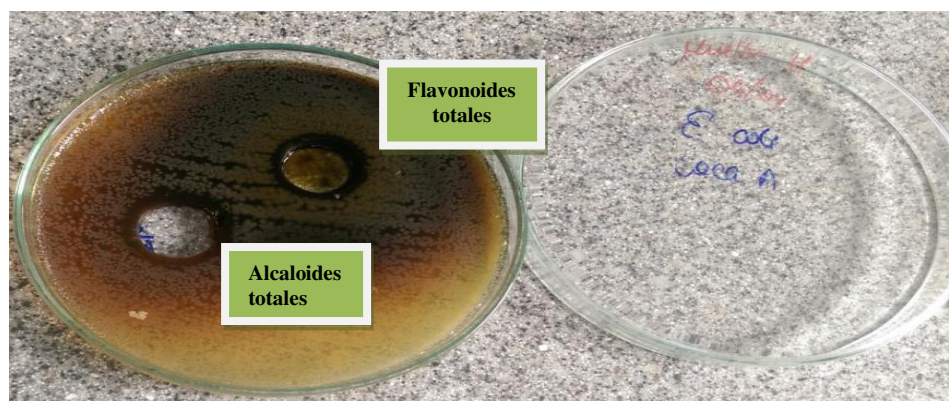
Fuente. Elaboración propia, diciembre 2016.



**Figura 11.** Actividad antibacteriana de los alcaloides y flavonoides totales del extracto etanólico de las hojas de *Erythroxylum coca* Lam frente a *Staphylococcus aureus*.  
Fuente. Elaboración propia, diciembre 2016.

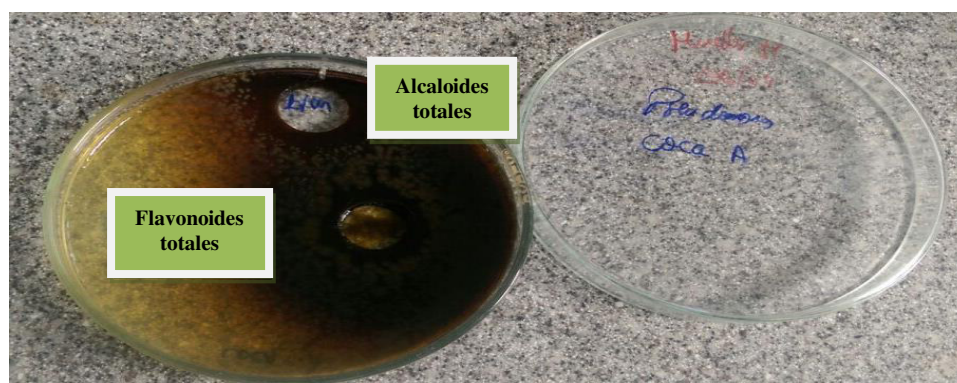


**Figura 12.** Actividad antibacteriana de los alcaloides y flavonoides totales del extracto etanólico de las hojas de *Erythroxylum coca* Lam frente a *Staphylococcus epidermidis*.  
Fuente. Elaboración propia, diciembre 2016.

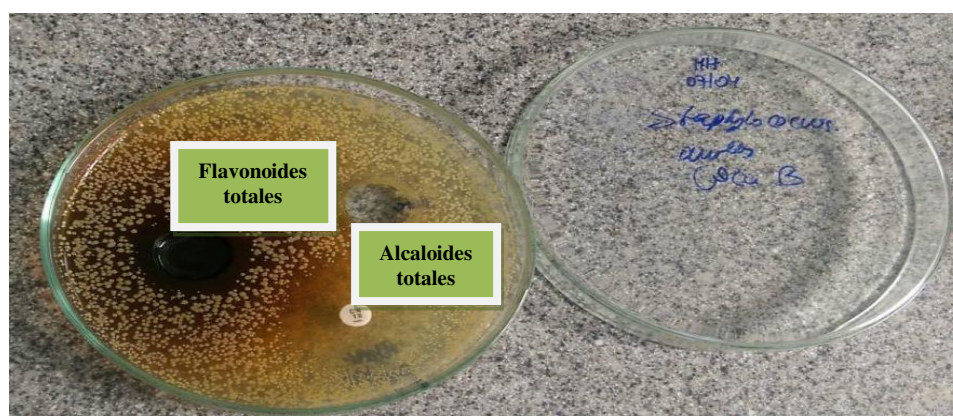


**Figura 13.** Actividad antibacteriana de los alcaloides y flavonoides totales del extracto etanólico de las hojas de *Erythroxylum coca* Lam frente a *Escherichia coli*. Fuente. Elaboración propia, diciembre 2016.

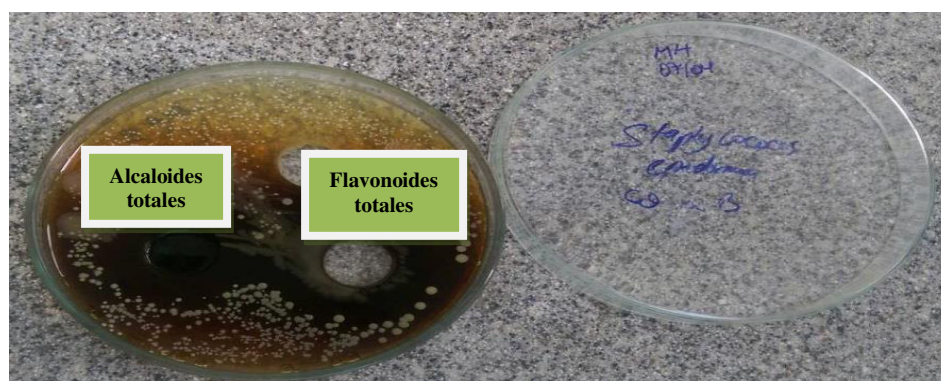




**Figura 14.** Actividad antibacteriana de los alcaloides y flavonoides totales del extracto etanólico de las hojas de *Erythroxylum coca* Lam frente a *Pseudomonas aeruginosa*. Fuente. Elaboración propia, diciembre 2016.



**Figura 15.** Actividad antibacteriana de los alcaloides y flavonoides totales del extracto etanólico de las hojas de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron frente a *Staphylococcus aureus*. Fuente. Elaboración propia, diciembre 2016.



**Figura 16.** Actividad antibacteriana de los alcaloides y flavonoides totales del extracto etanólico de las hojas de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron frente a *Staphylococcus epidermidis*. Fuente. Elaboración propia, diciembre 2016.



**Figura 17.** Actividad antibacteriana de los alcaloides y flavonoides totales del extracto etanólico de las hojas de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron frente a *Escherichia coli*. Fuente. Elaboración propia, diciembre 2016.



**Figura 18.** Actividad antibacteriana de los alcaloides y flavonoides totales del extracto etanólico de las hojas de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron frente a *Pseudomonas aeruginosa*. Fuente. Elaboración propia, diciembre 2016.

**Tabla 12.** Halos de inhibición para los controles positivo y negativo

	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Control positivo (antibiótico)	<i>Gentamicina</i>	<i>Ciprofloxacino</i>	<i>Ciprofloxacino</i>	<i>Gentamicina</i>
	30	68	48	16
Control negativo (DMSO+agua)	---	---	18	---

Fuente. Elaboración propia, diciembre 2016.

#### **4.1.8. Bioensayo de citotoxicidad en erizos de mar (*Tetrapyguis niger*)**

Luego de 24 h los viales fueron retirados de la incubadora para observar los efectos del tratamiento.

A 10 µg/mL, 100 µg/mL y 1 000 µg/mL, *Erythroxyllum novogranatense* (Morris) Hieron, no produjo ningún cambio en el desarrollo del erizo de mar, ya que los embriones se encontraban al igual que en el control en estado de blástula un 20 % de la población y en gástrula un 80 % de la población.

En cambio, *Erythroxyllum coca* Lam, a 1 000 µg/mL produjo un efecto en el desarrollo de erizo de mar, ya que se encontraban en su mayoría en blástula, esto es, se observa un retardo en el desarrollo.

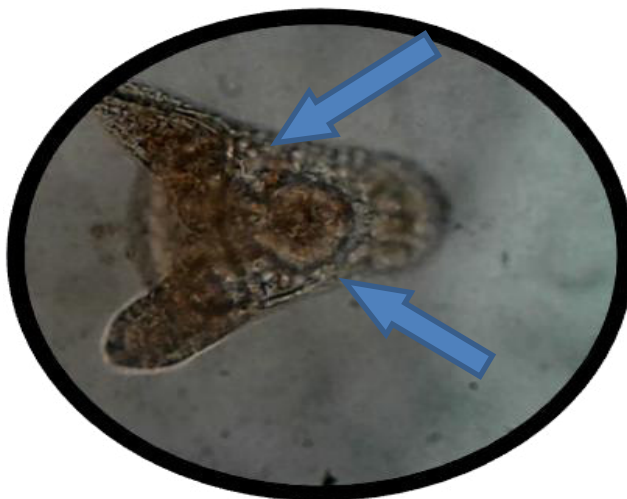
Se retornaron los frascos viales a la incubadora y se repitieron las observaciones a las 48 h.

A las 48 h, *Erythroxyllum novogranatense* (Morris) Hieron, se comportó como el control que se encontraba en etapa de prisma tanto a 10 µg/mL, 100 µg/mL y 1 000 µg/mL.

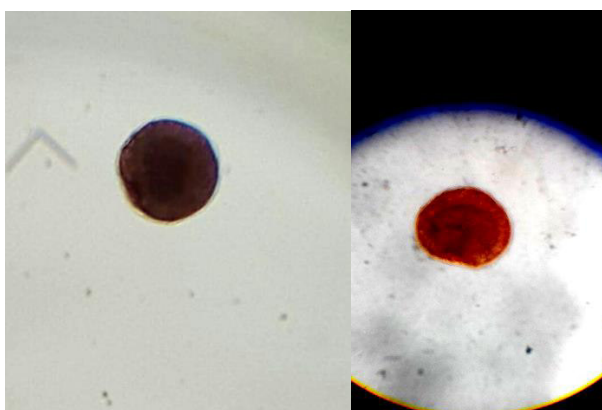
*Erythroxyllum coca* Lam, a 1 000 µg/mL presentaba el estado de gástrula en un 80 % de la población y el estado de prisma en un 20 % de la población; con alteraciones en su estructura esquelética, por lo que debe haber alguna molécula química que ha provocado dicho efecto.

El bioensayo en ***Tetrapyguis niger*** se realizó frente a los extractos, y se puede observar alteraciones en el estado de prisma al no observarse estructura esquelética con el extracto de *Erythroxyllum coca* Lam a 1 000 µg/mL; mientras que *Erythroxyllum novogranatense* (Morris) Hieron, no presento actividad.





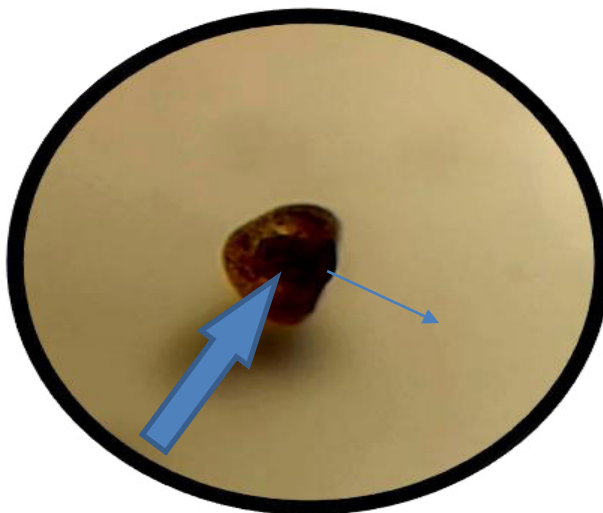
**Figura 19.** Embrión normal de erizo de mar (*Tetrapyrgus niger*) en estado de pluteus. Las flechas indican la estructura esquelética. Magnificación 400X. Fuente. Elaboración propia, mayo 2017.



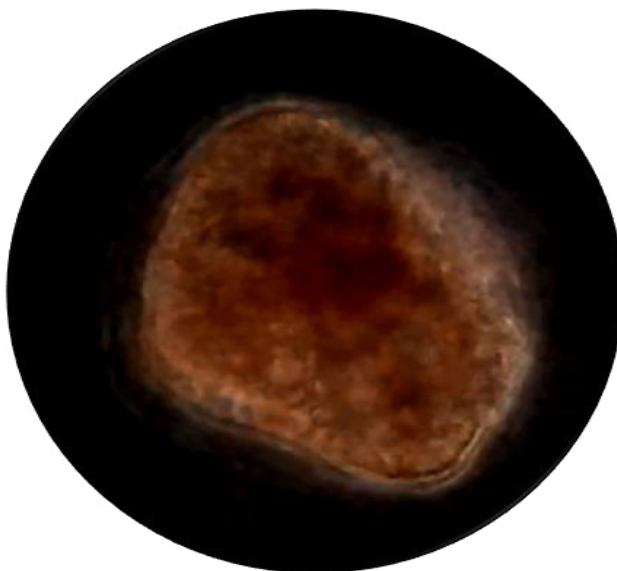
A

B

**Figura 20.** (A) Embrión normal de erizo de mar (*Tetrapyrgus niger*) en estado de blástula. (B) Embrión normal de erizo de mar (*Tetrapyrgus niger*) en estado de gástrula. Magnificación 100X. Fuente. Elaboración propia, mayo 2017.



**Figura 21.** Embrión normal de erizo de mar (*Tetrapygus niger*) en estado de prisma. La flecha delgada indica el arquenterón o intestino primitivo. La flecha gruesa indica la estructura esquelética. Magnificación 100X. Fuente. Elaboración propia, mayo 2017.



**Figura 22.** Embrión de erizo de mar (*Tetrapygus niger*) en un estado de prisma alterado. No se observan estructuras esqueléticas por el efecto de *Erythroxylum coca* Lam a 1000 µg/mL; Magnificación 400X. Fuente. Elaboración propia, mayo 2017.

## 4.2. Discusión

Para realizar el presente trabajo de investigación, se utilizaron las hojas de coca provenientes del distrito de Samugari, provincia de La Mar, departamento de Ayacucho; y del norte del Perú de la provincia de Trujillo, departamento de La Libertad. Siendo acopiadas y proporcionadas por la Empresa Nacional de la Coca S.A.

La clasificación taxonómica de las especies estudiadas *Erythroxylum coca* Lam y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron, fueron realizadas por el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, según Constancias N° 07-USM-2013 y 08-USM-2013 (anexo 1 y 2).

El presente trabajo, tuvo como objetivo, evaluar la actividad antioxidante, la actividad antibacteriana, la toxicidad en *Artemia salina* y citotoxicidad sobre erizos de mar (*Tetrapygus niger*) de los alcaloides y flavonoides de las hojas de ambas especies vegetales, a fin de contribuir a validar el uso tradicional; ya que este género, ha sido más explorado química, que biológicamente (González *et al.*, 2005).

Se procedió a la obtención de los alcaloides y flavonoides de los extractos etanólicos de las hojas de *Erythroxylum coca* Lam y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron, debido a que existen reportes que indican que para la identificación de los metabolitos presentes en las hojas de las especies estudiadas, en la fase etanólica se encontraban la mayoría de los metabolitos secundarios, con lo que se demostró el predominio de los compuestos polares sobre los apolares en las hojas de estas plantas.

Se preparó el extracto crudo utilizando las hojas secas de *Erythroxylum coca* Lam y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron, pulverizados y

macerados en etanol 96° GL y luego se filtró en caliente. En la identificación de los metabolitos secundarios se emplearon pruebas o técnicas simples, rápidas, que requirieron un mínimo de equipamiento y selectivas para determinados compuestos, realizándose los ensayos específicos, a cada metabolito aislado.

Se realizó el *screening* fitoquímico del extracto etanólico de las hojas de *Erythroxylum coca* Lam y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron, con el propósito de contribuir al conocimiento, con base científica, de los componentes presentes en él, de utilidad para posible elaboración de productos farmacéuticos.

Según las técnicas del *screening* fitoquímico, realizado para el extracto etanólico de las hojas de ambas especies, en la tabla 1 y 2; se reportan la presencia de alcaloides, flavonoides, fenoles, taninos y saponinas. Estos resultados obtenidos, fueron similares a los registrados por González *et al.* (2005) y Ansell *et al.* (1993); difiriendo de Palacin (2013) quien determinó esteroides y terpenos en ambos extractos, siendo reacción negativa para nosotros; en esta porción posiblemente existan estos metabolitos, pero en nuestro experimento posiblemente la sensibilidad para desarrollo del color no permite su identificación. Asimismo, se ha determinado la presencia de triterpenos en *Erythroxylum areolatum* L, *Erythroxylum suave* Lunan, *Erythroxylum havanense* Jacq, *Erythroxylum nummularia* y otras 14 especies de *Erythroxylum* (Ansell *et al.*, 1993).

En estudios realizados con flavonoides, como marcadores taxonómicos para la identificación de los tipos de flavonoides en *Erythroxylum*, se determinó su presencia en las especies de *E. coca* var. *Ipadu* (eridictiol, taxifolina, quercetina y kaempferol), *E. coca* var. *Coca* (Eridictiol), *E. novogranatense* var. *Truxillense* (quercetina, fisetina, kaempferol), *E. novogranatense* var. *Novogranatense* (luteolina, kaempferol); concentradas mayormente en las hojas; y en menor concentración en tallo y raíz (Johnson *et al.*, 1998; Hegnauer, 1981).

Luego de realizar el *screening* fitoquímico, procedimos a la extracción y cuantificación de los alcaloides y flavonoides totales (Turner, 1981; Nagai, 2012), por ser los metabolitos secundarios que se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal, con múltiples propiedades farmacológicas (Gutiérrez y col., 2000), entre ellas, la acción antibacteriana y antioxidante, en las cuales nos apoyamos para realizar este trabajo de investigación.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la tabla 3, referente a los alcaloides obtenidos del extracto etanólico de las hojas de *Erythroxylum coca* Lam y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron; la mayor concentración de alcaloides totales fue obtenida de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron, con un promedio de 95 - 100 mg/g; mientras que, para *Erythroxylum coca* Lam, se obtuvo como promedio de 70 – 80 mg/g. En el caso de los flavonoides, obtuvimos como promedio 610 mg/g para *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron; siendo mayor que *Erythroxylum coca* Lam, con un promedio de 590 mg/g. En ambas especies, se identificó la presencia de los flavonoides: chalconas y flavonoles, coincidiendo con Hegnauer (1981), quien menciona que en el género *Erythroxylum*, la mayoría de ellos están presentes como 3-O-monoglicósidos con D-glucosa, D-galactosa, D-arabinosa, D-xilosa y L-ramnosa; también se presentan como 3-O-diglicósidos, combinando los azúcares mencionados; y entre las agliconas prevalentes como flavonoles, se presentan kaempferol, quercetina y ombuin. En menor proporción se hallan a las flavanonas, flavanos, isoflavonas, flavonas y chalconas (González *et al.*, 2005).

La cuantificación de alcaloides totales, se llevó a cabo por el método estandarizado de la USP 34-2011. En la tabla 4, se reporta la presencia de los alcaloides cocaína y benzoilecgonina, para ambas especies estudiadas; y en la tabla 5, se menciona que el contenido de alcaloides aislados presentes en el extracto fue de 2,69 % para *Erythroxylum coca* Lam, y de 1,67 % para *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron. Según los datos de la Unodc, la especie *Erythroxylum novogranatense*

(Morris) Hieron var. *Truxillense* (Rugby) Plowman, tiene un contenido normal de 0,42 - 1,02 %, *Erythroxylum novogranatense* var. *Novogranatense* 0,17 – 0,76 % y *E. coca* var. *Ipadu* contiene 0,11 – 0,41 %. Para Galindo (2009) las hojas de coca de la especie *coca* cv. *Lambran* tiene 1,12 % y *coca* cv. *Mollecoca* 0,86 % (Unodc, 2016). Los resultados del presente trabajo, están de acuerdo y/o se encuentran dentro del límite reportado para el contenido de alcaloides en estas especies vegetales (Bezauger, 1965).

En la hoja de coca encontramos compuestos como la cocaína, cinamoilcocaína, metilecgonina, benzoilecgonina, ecgonina, norcocaína, N-formilnorcocaína, higrina, tropinona, *trans*-cinamoilcocaina, *cis*-cinamoilcocaina, cuscohigrina y tropacocaina (Johnson *et al.*, 1994; Galindo *et al.*, 2009; Unodc, 2016).

Los estudios fitoquímicos desarrollados con especies de este género, según las bases de datos consultadas, reportan con mayor frecuencia a *Erythroxylum coca* (14,0 %), *E. coca* var. *Coca* (11,9 %), *E. zambesiacum* (8,0 %), *E. hypericifolium* (6,7 %) y *E. monogynum* (6,7 %). También se han estudiado especies como *E. australe* (4,4 %), *E. novogratense* var. *Truxillense* (4,4 %), *E. pictum* (4,3 %), *E. argentinum* (3,3 %), *E. rotundifolium* (2,7 %) y *E. Rufum* (2,7 %) (González *et al.*, 2005).

Respecto a la variedad *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron var. *Truxillense* (Rusby) Plowman “Coca Trujillo”, al parecer proviene de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron, que fue introducida de Colombia al Perú durante el periodo Incaico; siendo morfológicamente muy similares (Machado, 1972; Plowman, 1982).

La detección de extractos de plantas medicinales con acción farmacológica específica es el propósito final de las investigaciones. La fuerte acción tóxica de un extracto vegetal o la demostración de su toxicidad *in vivo* constituyen limitaciones relevantes para la búsqueda (González *et al.*, 2005).

La toxicidad *in vivo* de un organismo animal puede usarse como método conveniente para el seguimiento y fraccionamiento en la búsqueda de nuevos productos naturales bioactivos; por tal razón, en el presente trabajo se decidió realizar el bioensayo de letalidad sobre nauplios de *Artemia salina*. Este organismo es fácil de cultivar y manipular en laboratorio, es sensible a una gran variedad de tóxicos; y genera resultados confiables en cuanto alternativa poco costosa, sencilla y rápida (Forero, 2002).

El bioensayo de letalidad de larvas de *Artemia salina* ha sido utilizado con eficiencia para detectar componentes con acción tóxica (Solís *et al.*, 1993; Valdés *et al.*, 2003; Meyer *et al.*, 1982; Mackeen *et al.*, 2000) y ha demostrado buena correlación al evaluar extractos de plantas con la toxicidad aguda oral en ratones (Lagarto *et al.*, 2001). Estos hallazgos refuerzan la importancia de la utilización de este ensayo como prueba alternativa de toxicidad.

Con vistas a correlacionar la acción tóxica mostrada por extractos de plantas con otras actividades biológicas o con la presencia de determinados componentes químicos, varios autores reportan una clasificación de la toxicidad según el valor de la CL<sub>50</sub> del extracto. Aunque estas clasificaciones poseen variaciones entre sí, todas coinciden en agrupar los extractos con CL<sub>50</sub> inferiores a 100 µg/mL en las categorías de mayor toxicidad, mientras, los que muestran valores superiores a 1 000 µg/mL se clasifican como no tóxicos (Valdés *et al.*, 2003; Meyer B. *et al.*, 1982; Sanabria, López & Gualdrón, 1997; Cyted, 1995).

De acuerdo a la tabla 6, los resultados obtenidos en el bioensayo de toxicidad letal media en *Artemia salina*; se puede decir que son favorables, ante el hecho de que la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) de los alcaloides aislados de *Erythroxylum coca* Lam y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron, fueron de 1 741,825 µg/mL y 1 647,459 µg/mL, respectivamente; confirmando que no mostraron toxicidad frente al ensayo realizado (Cyted, 1995).

En el estudio de la toxicidad de los extractos de *Erythroxylum confusum* Brit. mediante el bioensayo *Artemia salina*; evaluando las diferentes épocas de colecta, los tipos de preparación de extractos y del método de secado, determinó que para ninguno de los ensayos realizados, el valor promedio de la CL<sub>50</sub> se comportó por debajo de 640 µg/mL. Considerando de manera general que las preparaciones obtenidas de la especie estudiada, como no tóxicas (Martínez, González, Culebras & Tuñón, 2002).

En la tabla 8 se muestran los resultados de la actividad antioxidante de los flavonoides de las hojas de *Erythroxylum coca* Lam y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron, mediante el método de captación del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) expresado en IC<sub>50</sub>; estimado y comparado con ácido ascórbico (control positivo); correspondiendo para la especie *Erythroxylum coca* Lam, la concentración inhibitoria (IC<sub>50</sub>) fue de 611,29 µg/mL; mientras que para *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron, fue de 250,29 µg/mL.

Existe un consenso de que la actividad antioxidante de los flavonoides resulta de una combinación de sus propiedades quelantes de hierro y secuestradoras de radicales libres (Böhm *et al.*, 1998). Otros autores se refieren además a la inhibición de oxidasas, como la lipoxigenasa, la ciclooxigenasa, la mieloperoxidasa, la NADPH oxidasa y la xantina oxidasa (Ferrándiz *et al.*, 1991; Groot *et al.*, 1998); evitando la generación de especies reactivas del oxígeno *in vivo*, así como de hidroperóxidos orgánicos. Por otra parte, se ha podido conocer que también inhiben enzimas involucradas indirectamente en los procesos oxidativos, como la fosfolipasa A2, al mismo tiempo que estimulan otras con reconocidas propiedades antioxidantes: catalasa y superóxido dismutasa. De esta forma los flavonoides interfieren en las reacciones de propagación de radicales libres y en la formación del radical en sí (Pérez, 2003). Los flavonoides cumplen con los criterios químicos-estructurales que establecen su capacidad antioxidante (Martínez-Flores *et al.*, 2002).



En otra investigación, se determinó la actividad antioxidante *in vitro* del aceite esencial de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) var. *Truxillense*, como donador de electrones, utilizando el método de captación del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), se demostró que presenta actividad antioxidante.

La actividad antibacteriana se realizó por la técnica de difusión en agar, teniendo como indicador el diámetro del halo de inhibición. En cuanto a la actividad antibacteriana, en términos de tamaño de halo de inhibición, es destacable el valor encontrado para los alcaloides y flavonoides aislados pertenecientes a *Erythroxylum coca* Lam (tabla 10), siendo superiores a la presentada por el control positivo (gentamicina) (tabla 12).

Los alcaloides aislados de *Erythroxylum coca* Lam, mostraron mayor actividad antibacteriana frente a *S. epidermidis* y *P. aeruginosa*; que los alcaloides de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron (tablas 10, 11 y 12), mientras que los alcaloides aislados de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron, demostró mayor actividad antibacteriana frente a *S. aureus* y *E. coli*; que los alcaloides de *Erythroxylum coca* Lam (tablas 10, 11 y 12).

En cambio, los flavonoides de *Erythroxylum coca* Lam, destacaron por su buena actividad antibacteriana frente a *P. aeruginosa*; mientras que los flavonoides de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron, mostraron mayor actividad antibacteriana frente a *S. epidermidis* y *S. aureus*; *igualando ambos frente a E. coli* (tablas 10, 11 y 12).

Si bien no existen antecedentes que comparen la actividad antibacteriana de los alcaloides y flavonoides empleados en este estudio, los resultados presentados por cada uno de ellos, y analizados de manera individual, coinciden con las investigaciones realizadas acerca de los alcaloides y flavonoides de *Erythroxylum coca* Lam y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron.

En investigaciones revisadas, el extracto hidroalcohólico de *Erythroxylum novogranatense* (Plowman) var. *Truxillense*; a la concentración de 25 y 50

µg/mL mediante el método de difusión en agar con discos, presentó actividad antibacteriana sobre *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Actinomyces viscosus*, *Prevotella melaninogénica* y *Fusobacterium nucleatum* (Alvarado et. al, 2010).

En la investigación realizada por Borrovic (2006), el extracto alcohólico de las hojas de *Erythroxylum novogranatense* var. *Truxillense*, a la concentraciones de 250, 500, 1000 y 1500 µg/20mL presentaron actividad antibacteriana frente a la flora mixta salival.

Estudios realizados con los extractos acuoso, ácido y alcohólico de las hojas secas de *Erythroxylum coca* var. *Coca*, demostraron que no presentan efecto *in vitro* sobre el crecimiento de *Candida albicans* y *Trichophyton mentagrophytes*; pero si frente a *Trichophyton rubrum* y *Microsporum canis* en extracto alcohólico. Además, hubo diferencia de velocidad de crecimiento de *Candida albicans*, *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes* en extracto acuoso, ácido y alcohólico.

Otros estudios han encontrado que el aceite esencial de las hojas frescas de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) var. *Truxillense*, presentan actividad antibacteriana *in vitro* frente a *Streptococcus mutans*, en las concentraciones de 50 y 100 % (Castro, 2008).

En el embrión de erizo de mar de 16 células, la especificación de las micrómeras por la β-catenina está mediada por el gen **Pmar1**. Este gen codifica un factor de transcripción que actúa como un represor transcripcional. El gen que este reprime es un gen no identificado cuyo producto es un represor de varios genes que caracterizan a las células mesenquimáticas primarias (Oliveri et al., 2002).

Por lo tanto **Pmar1** permite la desrepresión de genes como Tbr, Ets y Dri, que encienden a los genes que forman el esqueleto (Davidson et al., 2002).

Es muy probable que *Erythroxylum coca* Lam a 1000 ug/ml, haya alterado la red regulatoria de las micrómeras que enciende a los genes que forman

el esqueleto en erizo de mar. Es importante resaltar que la alteración ha sido producida en etapas tempranas del desarrollo de erizo de mar (16 células) y la observación de dicha alteración la observamos en etapas tardías del desarrollo (estado de prisma).

La actividad citotóxica presentada por el extracto de *Erythroxylum coca* Lam, se debería en gran parte a la presencia de los alcaloides y flavonoides presentes en su composición, de los cuales se tiene referencia que presentan dicha actividad en otras especies vegetales.

## CONCLUSIONES

1. En los extractos etanólicos de las hojas de *Erythroxylum coca* Lam y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron, se lograron identificar los principales metabolitos secundarios, destacándose la presencia de alcaloides, flavonoides, fenoles, saponinas y taninos. Asimismo, en ambas especies se identificaron los alcaloides: cocaína y benzoilecgonina; y los flavonoides: chalconas y flavonoles.
2. Los alcaloides aislados de *Erythroxylum coca* Lam y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron, no mostraron toxicidad en el modelo de *Artemia salina*.
3. En las condiciones experimentales, se ha comprobado que los flavonoides aislados de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron, presentan mayor actividad antioxidante que los flavonoides de *Erythroxylum coca* Lam.
4. Los alcaloides aislados de *Erythroxylum coca* Lam, exhibieron buena actividad antibacteriana frente a *S. epidermidis* y *P. aeruginosa*; excepto con *E. coli* donde *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron tuvo mejor actividad. Los flavonoides aislados de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron mostraron actividad antibacteriana frente a la bacteria *S. epidermidis* (tablas 10, 11 y 12).
5. El extracto crudo de *Erythroxylum coca* Lam a 1000 µg/mL, alteró la red regulatoria de las micrómeras que enciende a los genes que forman el esqueleto en erizo de mar, lo que se puede definir como un efecto genotóxico.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agapito Francia, T., & Sung de Agapito, I. (2004). Fitomedicina: 1100 Plantas medicinales. Lima: Editorial Isabel IRL.
- Aguilar Felices, E. J. (2006). Estudio de los flavonoides aislados de las hojas de *Smallanthus sonchifolius* (yacón) y determinación de su actividad antioxidante e inmunológica. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima.
- Aguilar, E., & Encarnación, J. (1995). Comportamiento *in vitro* de *Erythroxylum coca lam var. Coca* y *Erythroxylum novogranatense var. Truxillense* “Mate de Coca” sobre *Mycobacterium tuberculosis* y otras especies de *mycobacterium*. Tesis de título profesional. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima.
- Agusti, A., Picada, R., Cassel, A., Mansur, M., Janovick, V., Batista, J., & et al. (2009). Antioxidant activities of flavonol derivatives from the leaves and stem bark of *Scutia buxifolia* Reiss. *Bioresource Technology*, (100), 6592-6598.
- Alcaraz, L., Blanco, S., Puig, O., Tomas, F., & Ferretti, F. (2000). Antibacterial activity of flavonoids against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J Theor Biol*, 205, 231–240.
- Alghazeer, R., Elmansori, A., Sidati, M., Gammoudi, F., Azwai, S., Naas, H., Eldaghayes, I. (2017). *in vitro* Antibacterial Activity of Flavonoid Extracts of Two Selected Libyan Algae against Multi-Drug Resistant Bacteria Isolated from Food Products. *Journal of Biosciences and Medicines*, 5, 26-48.
- Ansell, S., Pegel, K., & Taylor, D. (1993). Phytochemistry. The International Journal of Plant Biochemistry (32), 945-959.
- Arima, H., Ashida, H., & Danno, G. (2002). Rutin-enhanced antibacterial activities of flavonoids against *Bacillus cereus* and *Salmonella enteritidis*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 66, 1009-1014.

- Bae, E., Han, M., & Kim, D. (1999). In vitro anti-Helicobacter pylori activity of some flavonoids and their metabolites. *Planta Med*, 65, 442–443.
- Böhm, H., Boeing, H., Hempel, J., Raab, B., & Kroke, A. (1998). Flavonols, flavone and anthocyanins as natural antioxidants of food and their possible role in the prevention of chronic diseases. *Z Ernährungswiss* (37), 147-163.
- Borrovic Ramos, F. (2006). Efecto antibacteriano del extracto alcohólico de la hoja de *Erythroxylum novogranatense* var. *Truxillense* (coca) sobre la flora mixta salival. Tesis de título profesional. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima.
- Brack, A. (2011). *Diccionario enciclopédico de plantas útiles del Perú* (2da ed.). Lima: Fondo Editorial ARR.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia Fitoquímica Plantas Medicinales* (2da ed.). Zaragoza: Editorial Techinque et Documentation-Lavoisier.
- Castañeda Castañeda, B., Castro de la Mata, R., Manrique Mejía, R., Paredes Anaya, M., & Ibáñez Vásquez, L. (2003). Evaluación de la acción citotóxica y embriotóxica del extracto metanólico de *Alchornea castaneifolia* "Hiporuro". *Ciencia e Investigación UNMSM*, 21 (17), 13-21.
- Castro, A. J. (2008). Composición química del aceite esencial de las hojas de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) "Coca" actividad antioxidante y determinación antibacteriana frente a *Streptococcus mutans*. Tesis doctoral. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima.
- Castro, A., Juárez, J., Ramos, N., Suárez, S., Retuerto, F., & Gonzáles, S. (2011). Elucidación estructural del aceite esencial de *Ruta graveolens* L. ruda, actividad antioxidante y bioensayo de citotoxicidad. *Ciencia e Investigación UNMSM*, 14(1), 25-28.

- Céspedes, T., & Sánchez, D. (2000). Algunos aspectos sobre el estrés oxidativo, el estado antioxidante y la terapia de suplementación. *Rev. Cubana Cardiología*, 14(1), 55-60.
- Chacha, M., Bojase Moleta, G., & Majinda, R. (2005). Antimicrobial and radical scavenging flavonoids from the stem wood of *Erythrina latissima*. *Phytochemistry*, 66, 99-104.
- Chávez, R., Plaza, A., & Lock, O. (1996). Antioxidantes de origen vegetal. *Revista de Química* (10), 71-101.
- Collazos, C., Urquieta, R., & Alvistur, E. (1965). Simposium sobre Nutricion: Nutricion y Coqueo. *Revista viernes médico*, 6 (36-44). Lima.
- Cottiglia, F., Loy, G., & Garau, D. (2001). Antimicrobial evaluation of coumarins and flavonoids from the stems of *Daphne gnidium* L. *Phytomedicine*, 8, 302-305.
- Cueva, A., González, M., Infantes, D., Fukusaki, A., & León Cam, J. (1980). Obtención de extractos de coca descocainizados y como sub-producto cocaína. *Sociedad Química del Perú, XLVI* (3), 223-233.
- Cushnie, T. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26, 343-356.
- CYTED (1995). Manual de técnicas de investigación. *Química Fina Farmacéutica*. Panamá: Red Interamericana de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo.
- Dall'Agnol, R., Ferraz, A., & Bernardi, A. (2003). Antimicrobial activity of some *Hypericum* species. *Phytomedicine*, 10, 511-516.
- Dastidar, S., Manna, A., & Kumar, K. (2004). Studies on the antibacterial potentiality of isoflavones. *Int J Antimicrob Agents*, 23, 99-102.
- Davidson, E. H., Rast, J. P., Oliveri, P., Ransick, A., Calestani, C., Yuh, C.-H., . . . Bolouri, H. (2002). A Provisional Regulatory Gene Network for Specification of Endomesoderm in the Sea Urchin Embryo.
- Díaz, L. M. (1971). Coca Leaves, Cocaine and its substitutes. *Circular Farmacéutico*, 230(29), 59-81.

- El Abyad , M., Morsi , N., Zaki , D., & Shaaban , M. ( 1990). Preliminary screening of some Egyptian weeds for antimicrobial activity. *Microbios*, 62, 47–57.
- Enciso Roca, E. C. (2011). Actividad antiinflamatoria y antioxidante de los flavonoides extraídos de las hojas de *Jungia rugosa* Less "matico de puna". Tesis doctoral. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima.
- European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing EUCAST. (2000). Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution. *Clinical Microbiology and Infection*, 6(9), 509-515.
- Faizi, S., & Ali , M. (1999). Shamimin: a new flavonol C-glycoside from leaves of *Bombax ceiba* . *Planta Med* , 65, 383-385.
- Ferrándiz , M., & Alcaraz , M. (1991). Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids . *Agents Actions* (32), 283-288.
- Forero, G. (2002). Estudio Fitoquímico del extracto etanólico de la madera de "*Virola carinata*" (*Myristicaceae*). Tesis, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Freixa, B., Vila , R., Vargas, L., Lozano , N., Adzet , T., & Cañigüeral, S. (1998). Screening for antifungal activity of nineteen Latin American plants . *Phytotherapy Research*, 12 (6), 427-430.
- Fukui, H., Goto , K., & Tabata, M. (1988). Two antimicrobial flavanones from the leaves of *Glycyrrhiza glabra* . *Chem Pharm Bull*, 36, 4174-4176.
- Galindo Bonilla, A., & Fernández Alonso, J. (2009). Especies cultivadas del género *Erythroxylum* P. Browne. Revisión del tema desde la perspectiva forense . *INMLCF-Colombia Forense*, 11.
- Garro Gálvez, J., & Pastor de Abram, A. (1990). Cocaína: avances en su investigación. *Sociedad Química del Perú*, LVI (1), 12-20.
- González García, K., González Lavaut, J., González Guevara, J., & Prieto González, S. (2005). Género *Erythroxylum*:Análisis de la Información Científica. *Acta Farm. Bonaerense*, 24 (2), 284-290.



- Grande, J. M., & Davey, R. M. (1990). Antibacterial properties of propolis (bee glue). *Journal of the Royal Society of Medicine*, 83, 159-160.
- Groot, H., & Rauen, U. (1998). Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. *Fundam Clin Pharmacol* (3), 249-255.
- Harborne, J., & Baxter, H. (1999). *The handbook of natural flavonoid*. Chichester: John Wiley and Sons.
- Harborne, J., & Williams, C. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55, 481-504.
- Havsteen, B. (1983). Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem Pharmacol*, 32, 1141–1148.
- Havsteen, B. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics* (96), 67-202.
- Hegazi, A., Abd El Hady, F., & Abd Allah, F. (2000). Chemical composition and antimicrobial activity of European propolis. *Z Naturforsch*, 55, 70–75.
- Hegnauer, R. (1981). Chemotaxonomy of Erythroxylaceae. *Journal Ethnopharmacology* (3), 279-292.
- Hernández Peves, M. M. (2015). Actividad antioxidante y citotóxica de las fisalinas y de los flavonoides presentes en las hojas de *Physalis peruviana* L. Tesis de Maestría, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima.
- Herrera Calderón, O. (2014). Efecto antioxidante y antitumoral in vitro del extracto etanólico de la raíz de *Waltheria ovata* Cav. "lucraco" en línea celular de cáncer de próstata DU-145. Tesis de Maestría, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima.
- Jager, A., & Saaby, L. (2011). Review flavonoids and the CNS. *Journal Molecules*, 16(2), 1471-1485.
- Jasim Altameme, H., Hadi Hameed, I., & Abdulhasan Kareem, M. (2015). Analysis of alkaloid phytochemical compounds in the ethanolic extract of *Datura stramonium* and evaluation of antimicrobial activity. *African Journal of Biotechnology*, 14 (19), 1668-1674.

- Jasim, H., Omran Hussein, A., Hadi Hameed, I., & Abdulhasan Kareem, M. (2015). Characterization of alkaloid constitution and evaluation of antimicrobial activity of *Solanum nigrum* using gas chromatography mass spectrometry (GC/MS). *African Journal of Biotechnology*, 7 (4), 56-72.
- Johnson, E., & Emche, S. (1994). Variation of Alkaloid Content in *Erythroxylum coca* Leaves from Leaf Bud to Leaf Drop. *Annals of Botany*, 73(6), 645-650.
- Johnson, E., Schmidt, W., & Norman, H. (1998). Flavonoids as markers for *Erythroxylum* Taxa: *E. coca* var. *ipadu* and *E. novogranatense* var. *truxillense*. *Biochemical Systematics and Ecology* (26), 745-759.
- Kang, J., Li, Z., Wu, X., Jensen, G., Schauss, A., & Wu, X. (2010). Antioxidant capacities of flavonoid compounds isolated from acai pulp (*Euterpe olearacea* Mart). *Food Chemistry*, 122, 610-617.
- Karou, D., Savadogo, A., Canini, A., Yameogo, S., Montesano, C., Simpure, J., . . . Traore, A. (2005). Antibacterial activity of alkaloids from *Sida acuta*. *African Journal of Biotechnology*, 4 (12), 1452-1457.
- Kumar, B., Kaur Sandha, H., Prasher, S., Tiwari, P., Salhan, M., & Sharma, P. (2011). A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, 1(1).
- Lagarto, A., Silva, R., Guerra, I., & Iglesias, L. (2001). Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine*, 8 (5), 395-400.
- Leos Rivas, C., Rivas Morales, C., & García Hernández, D. (2016). Actividad antioxidante y toxicidad. Investigación en Plantas de Importancia Médica (págs. 56-57). Barcelona: OmniaScience.
- Li Sing, C. M. (1994). Propiedades inhibitorias del crecimiento de hongos oportunistas in vitro de *Erythroxylum coca* y *Erythroxylum novogranatense* var. *Truxillense* (Mate de Coca). Tesis de título profesional. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima.
- Li, W., Asada, Y., & Yoshikawa, T. (1998). Antimicrobial flavonoids from *Glycyrrhiza glabra* hairy root cultures . *Planta Med* , 64, 746-747.

- Lock, O., Cabello, I., & Doroteo, V. H. (Diciembre de 2006). *Análisis de flavonoides en plantas*. Recuperado el 13 de mayo de 2017, de [http://old.iupac.org/publications/cd/medicinal\\_chemistry/Practica-VI-6.pdf](http://old.iupac.org/publications/cd/medicinal_chemistry/Practica-VI-6.pdf)
- Lonkar, P., & Dedon, P. (2011). Reactive species and DNA damage in chronic inflammation: reconciling chemical mechanisms and biological fates . *Int J Cancer* (128), 1999-2009.
- Look, O. (1998). Investigación Fitoquímica Metodos en el estudio de productos naturales (2da ed.). Lima: Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú.
- Machado Cazorla, E. (1980). Determinación de Variedades y Cultivares en Cocas Peruanas. (P. Press, Ed.) Lima , Perú: Edit. .
- Mackeen , M., Ali , A., Lajis , N., Kawazu , K., Hassan , Z., Amran, M., & et al. (2000). Antimicrobial, antioxidant, anti-tumour-promoting and cytotoxic activities of different plant part extracts of *Garcinia atroviridis* Griff. Ex T. Anders. *J Ethnopharmacol.* (72), 395-402.
- Manosalva, L., Mutis, A., Urzúa, A., Fajardo, V., & Quiroz, A. (2016). Antibacterial Activity of Alkaloid Fractions from *Berberis microphylla* G. Forst and Study of Synergism with Ampicillin and Cephalothin. *Molecules*, 21(76), 1-10.
- Martínez Florez , S., González Gallego , J., Culebras, J., & Tuñón, M. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, 17(6), 271-278.
- Martínez Hormaza, I., Quintero Rodríguez, G., Márquez Montiel, L., Gonzáles Lavaut, J., Álvarez Reyes, A., & Zarragoitia, A. (2006). Determinación de la Citotoxicidad de Extractos de *Erythroxylum confusum* Britt. mediante el Método de la Artemia salina. *Acta Farm. Bonaerense*, 25 (3), 429-431.
- Mbata, T., Debiao, L., & Saikia, A. (2008). Antibacterial activity of the crude extract of Chinese Green Tea (*Camellia sinensis*) on *Listeria monocytogenes*. *African Journal of Biotechnology*, 7 (10), 1571-1573.

- Meyer, B., Ferrigni, N., Putnam, J., Jacobsen, L., Nichols, D., & McLaughlin, J. (1982). Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Journal of Medicinal Plant Research*, 45, 31-34.
- Middleton Jr., E., & Chithan, K. (1993). The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer. In: Harborne JB, editor. *The flavonoids: advances in research since 1986*. London, UK: Chapman and Hall.
- Mostacero Leon, J., Castillo Picon, F., Mejia Coico, F., Charcape Ravelo, J., Ramirez Vargas, R., & Gamarra Torres, O. (2011). *Plantas medicinales del Perú* (1ra ed.). Trujillo: Fondo Editorial de la Asamblea Nacional de Rectores.
- Nenadis, N., & Tsimidov, M. (2002). Observations on the estimation of scavenging activity of phenolic compound using rapid 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. (DPPH) Tests. *JAOCS*, 2002, 79 (12): 1191 - 95. Tests. *JAOCS*, 12(79), 1191 - 1195.
- Oliveri, P., Carrick, D. M., & Davidson, E. H. (2002). Regulatory Gene Network That Directs Micromere Specification in the Sea Urchin Embryo . *Developmental Biology* (246), 209-228.
- Osawa, K., Yasuda , H., Maruyama , T., Morita , H., Takeya , K., & Itokawa, H. (1992). Isoflavanones from the heartwood of *Swartzia polyphylla* and their antibacterial activity against cariogenic bacteria. *Chem Pharm Bull*, 40, 2970-2974.
- Ozcelik, B., Kartal, M., & Orhan, I. (2011). Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids. *Pharmaceutical Biology*, 49(4), 396-402.
- Palacin Custodio, M. A. (2013). Estudio de los flavonoides de la hoja de *Erythroxylum coca* Lam y *Erythroxylum novogranatense* var. *truxillense* y de su efecto antibacteriano. Tesis de titulo profesional, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima.
- Park, Y., & Ikegaki , M. (1998). Preparation of water and ethanolic extracts. of propolis and evaluation of the preparations. *Biosci Biotechnol Biochem* , 62, 2230–2232.

- Pepeljnjak, S., & Kosalec, I. (2004). Galangin expresses bactericidal activity against multiple-resistant bacteria: MRSA, *Enterococcus* spp. and *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett*, 240, 111-114.
- Pérez, G. (2003). Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Rev Cubana Invest Biomed*, 22(1), 48-57.
- Pérez Viscaino, F., Duarte, J., Jiménez, R., Santos Buelga, C., & Osuna, A. (2009). Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin. *Pharmacological Reports*, 61, 67-75.
- Plowman, T. (1980). Aspectos Botánicos de la Coca. En *Actas del Seminario Interamericano sobre Coca y Cocaína* (págs. 100-117). Lima Perú: Edit. Pacific Press.
- Rauha, J., Remes, S., & Heinonen, M. (2000). Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *Int J Food Microbiol*, 56, 3-12.
- Roig Mesa, T. (1965). *Plantas medicinales, aromáticas y venenosas de Cuba*. La Habana: Ed. Ciencia y Técnica Instituto del Libro.
- Sakagami, Y., Mimura, M., & Kajimura, K. (1998). Anti-MRSA activity of sophoraflavanone G and synergism with other antibacterial agents. *Lett Appl Microbiol*, 27, 98-100.
- Sanabria-Galindo, A., López, S., & Gualdrón, R. (1997). Estudio fitoquímico preliminar y letalidad sobre *Artemia salina* de plantas colombianas. *Rev Col Cienc Quím Farm.* (26), 15-19.
- Sato, Y., Suzuki, S., Nishikawa, T., Kihara, M., & Shibata, T. (2000). Phytochemical flavones isolated from *Scutellaria barbata* and antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Ethnopharmacol*, 72, 483-488.
- Sawai, J., Doi, R., Maekawa, Y., Yoshikawa, T., & Kojima, H. (2002). Indirect conductimetric assay of antibacterial activities. *Journal of industrial Microbiology and Technology*, 29, 296-298.
- Simin, K., Ali, Z., Khaliq Uz Zaman, S., & Ahmad, V. (2002). Structure and biological activity of a new rotenoid from *Pongamia pinnata*. *Nat Prod Lett*, 16, 351-357.

- Sivasothy, Y., Fariza, S., Leong, K., Ibrahim, H., & Awang, K. (2013). Antioxidant and antibacterial activities of Flavonoids and curcuminoids from *Zingiber spectabile* Griff. *Food Control*, 30, 714-720.
- Soukup, J. (1970). Vocabulario de los nombres vulgares de la flora peruana y catalogo de los géneros (1ra ed.). Lima, Perú: Edit. Salesiana.
- Stapleton, P., Shah, S., Anderson, J., Hara, Y., Hamilton Miller, J., & Taylor, P. (2004). Modulation of beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus* by catechins and gallates. 23, 462-467.
- Stapleton, P., Shah, S., & Hamilton Miller, J. (2004). Anti *Staphylococcus aureus* activity and oxacillin resistance modulating capacity of 3-O-acetyl-catechins. *Int J Antimicrob Agents*, 24, 374-380.
- Stella Ramírez, L., & Marín Castaño, D. (2009). Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica*, XV(42), 263-267.
- Su, Y., Li, S., Li, N., Chen, L., Zhang, J., & Wang, J. (2011). Seven alkaloids and their antibacterial activity from *Hypecoum erectum* L. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(22), 5428-5432.
- Tan, L., Yin, W., & Chan, K. (2013). Piper nigrum, Piper betel and gnetum Gnetum - natural food sources with anti-quorum sensing. *Sensors (Basel)*, 20(13), 3975-3985.
- Tanaka, J., Da Silva, C., Nakamura, C., Dias Filho, B., & De Olivera, A. (2006). Antibacterial activity of indole alkaloids from *Aspidosperma ramiflorum*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 39, 378-391.
- Tapas, A., Sakarkar, D., & Kakde, R. (2008). Flavonoids as Nutraceuticals: A review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 7(3), 1089-1099.
- Tepe, B., Daferera, D., Sökmen, M., Polissiou, M., & Sokmen, A. (2004). In vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and various extracts of *Thymus eigi* M. Zohary et P.H. Davis. *J. Agric. Food Chem.*, 52(5), 1132, 2004.

- Tereschuk, M., Riera , M., Castro , G., & Abdala LR, L. (1997). Antimicrobial activity of flavonoids from leaves of *Tagetes minuta*. *J. Ethnopharmacol* , 56, 227–232.
- Unodc (2016). *Monitoreo de Cultivos de Coca 2015*. Lima: Imaginen studios SAC.
- Valdés Iglesias, O., Díaz , N., Cabranes , Y., Acevedo , M., Areces, A., Graña, L., & et al. (2003). Macroalgas de la plataforma insular cubana como fuente de extractos bioactivos. *Avicennia*(16), 36-45.
- Ventura Yahuana, G. M. (2009). Determinación de la composición química del aceite esencial de *Erythroxylum coca Lam* var. *coca* mediante Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masa (CG/EM) y evaluación de su actividad antibacteriana. Tesis de título profesional. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima.
- Vijaya , K., & Ananthan, S. (1996). Therapeutic efficacy of medicinal plants against experimentally induced shigellosis in guinea pigs. *Indian J Pharm Sci* , 58, 191-193.
- Wang , S., Zhang , F., Feng , Q., & Li , Y. (1992). Synthesis, characterization, and antibacterial activity of transition metal complexes with 5 hydroxy-7,4-dimethoxyflavone. *J Inorg Biochem*, 46, 251-257.
- Well, A. (1978). Coca Leaf as a Therapeutic Agents. *The American Journal of Drug and Alcohol Abuse*, 5(1), 15-86.
- Wilkinson, J. (2006). Methods for Testing the Antimicrobial Activity of Extracts. *Modern Phytomedicine: Turning Medicinal Plants into Drugs* (págs. 157-171). Weiheim: Wiley-Vch Verlag GmbH & Co. KGaA.

## **ANEXOS**



# Anexo 1



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA  
**MUSEO DE HISTORIA NATURAL**



"Año Internacional de la Quinua"

## CONSTANCIA N°. 07-USM-2013

LA JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (Hojas), recibida de **Q.F. Vidal GAMARRA OCHOA**, de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos; ha sido estudiada y clasificada como: ***Erythroxylum coca* Lam.**; y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988):

**DIVISION: MAGNOLIOPHYTA**

**CLASE: MAGNOLIOPSIDA**

**SUB CLASE: ROSIDAE**

**ORDEN: LINALES**

**FAMILIA: ERYTHROXYLACEAE**

**GENERO: Erythroxylum**

**ESPECIE: *Erythroxylum coca* Lam.**

Nombre vulgar: "Coca".

Determinado por: Blgo. Mario Benavente.

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de estudios.

Fecha, 16 de enero de 2013

  
**Dra. HAYDEE MONTOYA TERREROS**  
JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

## Anexo 2



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA  
**MUSEO DE HISTORIA NATURAL**



**"Año Internacional de la Quinua"**

### CONSTANCIA N°. 08-USM-2013

LA JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (Hojas), recibida de **Q.F. Vidal GAMARRA OCHOA**, de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos; ha sido estudiada y clasificada como: ***Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron**; y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988):

**DIVISION: MAGNOLIOPHYTA**

**CLASE: MAGNOLIOPSIDA**

**SUB CLASE: ROSIDAE**

**ORDEN: LINALES**

**FAMILIA: ERYTHROXYLACEAE**

**GENERO: Erythroxylum**

**ESPECIE: *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron**

Nombre vulgar: "Coca".

Determinado por: Blgo. Mario Benavente.

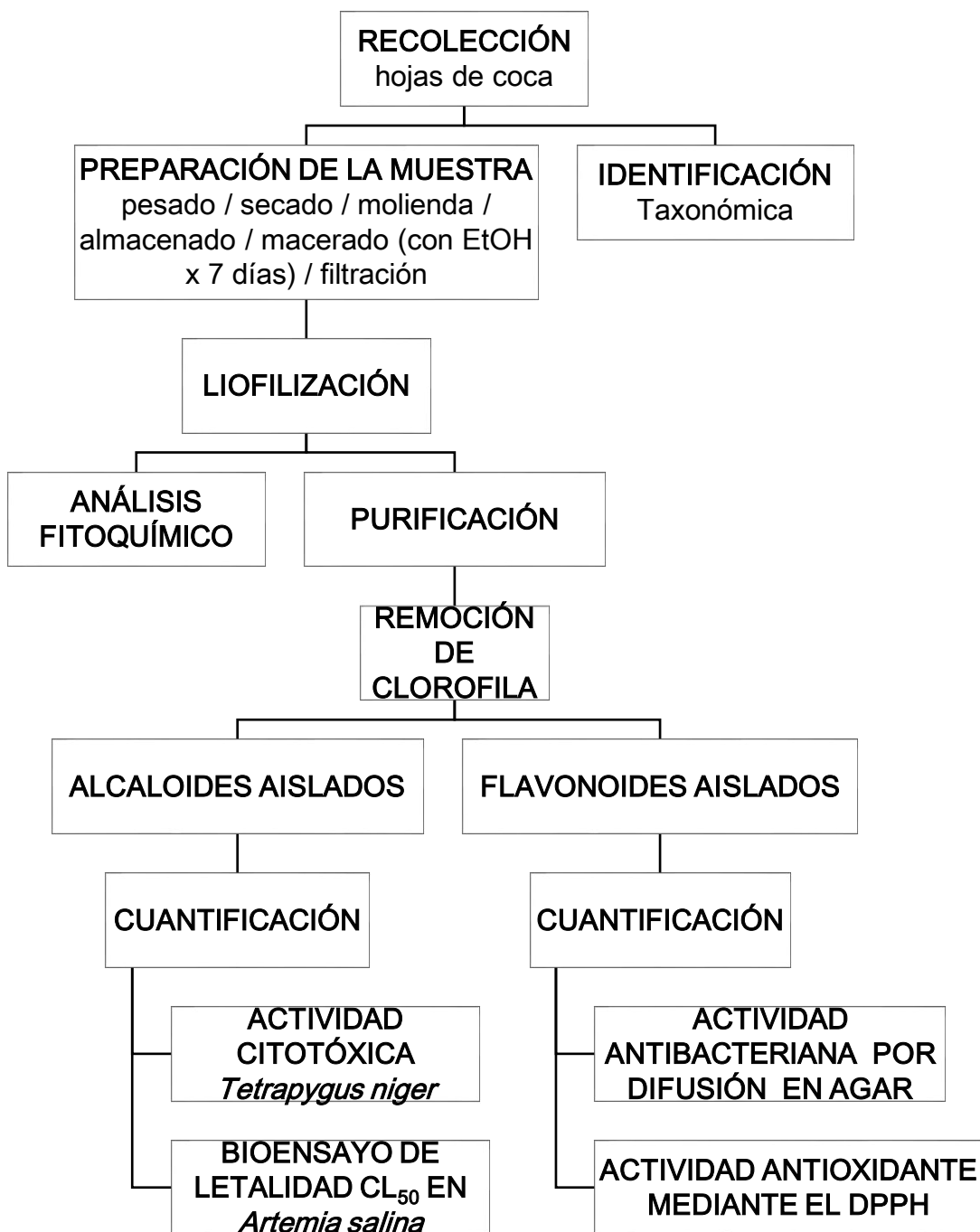
Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de estudios.

Fecha, 17 de enero de 2013



## Anexo 3

### Flujograma de las diferentes etapas de estudio



Fuente: Elaboración propia, 2017

## Anexo 4

### Remoción de clorofila

